

CAROLINA FERNANDA MANFREDI ZAMBON CLEMENTE

**INFLUÊNCIA DA QUINASE DE ADESÃO FOCAL
NA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA INDUZIDA
POR SOBRECARGA PRESSÓRICA EM CAMUNDONGOS**

CAMPINAS

Unicamp

2008

CAROLINA FERNANDA MANFREDI ZAMBON CLEMENTE

**INFLUÊNCIA DA QUINASE DE ADESÃO FOCAL
NA HIPERTROFIA MIOCÁRDICA INDUZIDA
POR SOBRECARGA PRESSÓRICA EM CAMUNDONGOS**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de
Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em
Fisiopatologia Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

CAMPINAS

Unicamp

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C591i	<p>Clemente, Carolina Fernanda Manfredi Zambon Influência da quinase de adesão focal na hipertrofia miocárdica induzida por sobrecarga pressórica em camundongos. / Sandra Cristina Barão. Campinas, SP : [s.n.], 2008.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : Kleber Gomes Franchini Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p style="text-align: center;">1. Hipertrofia. 2. Miocárdio. 3. Transdução de sinal. I. Franchini, Kleber Gomes. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês : Importance of focal adhesion kinase signaling in the cardiac hypertrophy induced by pressure overload in mice

**Keywords: . Hypertrophy
. Myocardium
. Signal transduction**

Área de concentração : Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutor em Medicina Experimental

**Banca examinadora: Profº. Drº. Kleber Gomes Franchini
Profº. Drº. Wilson Nadruz Júnior
Profº. Drº. Everardo Magalhães Carneiro
Profª. Drª. Regina Scivoletto
Profª. Drª Lusiane Maria Bendhack**

Data da defesa: 03-07-2008

Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Kleber Gomes Franchini

Kleber Franchini

Membros:

Professor (a) Doutor (a) Regina Scivoletto

Professor (a) Doutor (a) Lusiane Maria Bendhack

Professor (a) Doutor (a) Everardo Magalhães Carneiro

Professor (a) Doutor (a) Wilson Nadruz Junior

Wilson Nadruz Junior

Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 03/07/2008

DEDICATÓRIA

Ao meu pai.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Kleber Gomes Franchini, por além de me orientar, mostrar-se um amigo.

Aos colegas Thaís H. Theizen, José Roberto M. Souza, Thiago C. Pereira, Thaís Tornatore, Ana C. Deckmann, Alexandre Cardoso, Jackeline Lima, pelo apoio metodológico.

Aos professores Hernandes Faustino de Carvalho e Edson Rosa Pimentel (Instituto de Biologia- Unicamp) por disponibilizarem reagentes para o desenvolvimento de algumas etapas do projeto.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

*“The soul would have no rainbows
If the eyes had no tears”.
native American proverb*

	PÁG.
RESUMO	<i>xliv</i>
ABSTRACT	<i>xlix</i>
1- INTRODUÇÃO	53
1.1- Insuficiência cardíaca	55
1.2- Hipertrofia cardíaca	56
1.2.1- Patogênese da hipertrofia cardíaca.....	56
1.2.2- Tipos de hipertrofia cardíaca.....	56
1.2.3- Hipertrofia cardíaca compensada.....	57
1.2.4- Descompensação da hipertrofia cardíaca.....	59
1.3- Sinalização a estímulos hipertróficos	61
1.3.1- Estímulos neuro-humorais.....	62
1.3.2- Estímulos mecânicos.....	63
1.3.3- Quinase de adesão Focal (FAK).....	64
1.4- Hipótese	70
1.5- Objetivos	70
2- MATERIAIS E MÉTODOS	71
Materiais	73
2.1- Desenho de siRNA_{FAK}	74
2.2- Síntese de siRNA <i>in vitro</i>	74
2.3- Modelo animal	75
2.3.1- Injeção na veia caudal de camundongos.....	75
2.3.2- Injeção na veia jugular de camundongos.....	76
2.3.3- Coarctação da aorta.....	76

2.3.4- Medida de pressão arterial.....	76
2.3.5- Ecocardiografia.....	77
2.4- Coleta de sangue e dosagem de interferon γ no plasma de camundongos.....	78
2.5- Extrato total de proteínas.....	78
2.6- Isolamento de cardiomiócitos de camundongos adultos.....	79
2.7- Isolamento de fibroblastos de coração de camundongos adultos.....	80
2.8- Western blotting.....	81
2.9- Northern blotting.....	82
2.9.1- Extração de RNA de tecido cardíaco.....	82
2.9.2- Avaliação da integridade do RNA.....	82
2.9.3- Preparo da sonda.....	83
2.9.4- Northern blotting.....	84
2.10- Zimografia.....	85
2.11-Método de hidroxiprolina.....	86
2.12- RT-PCR.....	87
2.12.1- Extração de RNA de tecido cardíaco.....	87
2.12.2- Reação de RT-PCR em uma etapa.....	88
2.12.2.1- Multiplex β -MHC e GAPDH.....	88
2.13- Análise histológica.....	90
2.14- Imunohistoquímica.....	91
2.15- Análise estatística.....	91
3- RESULTADOS.....	93
3.1- Padronização do silenciamento gênico da FAK no miocárdio de camundongos por iRNA.....	95

3.1.1- Ensaios dose-resposta.....	95
3.1.2- Padronização da velocidade de injeção.....	96
3.1.3- Vias de administração de siRNA.....	98
3.1.4- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK.....	98
3.1.5- Análise do silenciamento do gene da FAK em cardiomiócitos e fibroblastos isolados de camundongos adultos.....	101
3.1.6- Controles do modelo de iRNA no miocárdio em camundongos.....	103
3.1.6.1- Análise da especificidade do siRNA _{FAK} - <i>off-targets</i>	103
3.1.6.2- Indução de resposta não específica- Interferon.....	104
3.1.6.3- Efeito sobre o crescimento de camundongos.....	105
3.1.7- Análise do efeito do siRNA _{FAK} na expressão da FAK em outros órgãos.....	106
3.2- Caracterização do modelo de hipertrofia do ventrículo esquerdo em camundongos.....	108
3.3- Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com siRNA_{FAK}.....	116
3.3.1- Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio.....	116
3.3.2- Análise hemodinâmica e ecocardiográfica do VE.....	120
3.3.3- Curva de crescimento.....	126
3.3.4- Avaliação do marcador molecular de hipertrofia cardíaca β-MHC.....	126
3.3.5- Análise histológica do miocárdio.....	129
3.3.6- Análise de mecanismos relacionados a fibrose cardíaca em resposta ao estímulo mecânico.....	132
3.3.6.1- Avaliação do conteúdo de colágeno no VE (biossíntese)...	132

3.3.6.2. Avaliação da atividade de MMP-2 no VE.....	133
3.3.6.3- Avaliação da expressão de MMP-2 em fibroblastos cardíacos.....	135
3.4- Avaliação do tratamento com siRNA_{FAK} da hipertrofia cardíaca compensada induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos.....	137
3.4.1- Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio.....	137
3.4.2- Análise hemodinâmica e ecocardiográfica do VE.....	139
3.4.3- Curva de crescimento.....	144
3.4.4- Avaliação do marcador molecular de hipertrofia cardíaca β -MHC.....	144
3.4.5- Análise histológica do VE.....	146
3.4.6- Curva de mortalidade.....	150
4- DISCUSSÃO.....	151
4.1- Silenciamento do gene da FAK <i>in vivo</i> por iRNA.....	154
4.2- FAK e hipertrofia.....	157
4.2.1- Modelo de coarctação da aorta em camundongos.....	157
4.3- Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com siRNA_{FAK}.....	158
4.4- Avaliação do tratamento com siRNA_{FAK} da hipertrofia cardíaca instalada induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos.....	162
5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	165
6- ANEXO.....	181
Artigo científico publicado.....	183

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Área do interstício
ANF	Fator natriurético atrial
bpm	Batimentos por minuto
BSA	Albumina bovina
CoAo	Coarctação da aorta
CT	Animais controle
DCM	Diâmetro dos cardiomiócitos
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DEPC	Solução de ditiopirocarbonato
DMEM	Dulbecco's modified eagle médium
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPR	Espessura relativa do ventrículo esquerdo
EPVE	Espessura do ventrículo esquerdo
FAK	Quinase de adesão focal
FC	Frequência cardíaca
FS	Fração de encurtamento
GFP	Proteína verde fluorescente
GrS	Gradiente sistólico
IB	<i>Imunoblotting</i>

IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
INF	Interferon
kDa	Quilodaltons
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MHC	Miosina de cadeia pesada
MMP	Metaloprotease
MMP-2	Metaloprotease-2
PAS _{CT}	Pressão arterial aferida na carótida
PAS _{FE}	Pressão aferida aferida na femoral
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato + solução salina
pFAK	Quinase de adesão focal fosforilada na tirosina 397
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAi	Interferência por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação de transcrição reversa com amplificação por PCR
SFB	Soro fetal bovino
Sham	Cirurgia fictícia
siRNA	RNA interferente pequeno
TAE	Tampão tris-EDTA
Tyr	Tirosina
VE	Ventrículo esquerdo
VH	Veículo

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela I- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta.....	109
Tabela II- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos tratados previamente com siRNA e submetidos a sobrecarga pressórica crônica.....	121
Tabela III- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações hipertróficos de camundongos tratados com siRNA.....	140

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Hipertrofia cardíaca em resposta a diversos estímulos.....	57
Figura 2- Esquema representativo da sinalização intracelular envolvida na hipertrofia cardíaca.....	62
Figura 3- Estrutura linear de FAK e mecanismo proposto para a ativação do complexo FAK/Src mediado por integrinas nos sítios de adesão focal.....	65
Figura 4- Esquema representativo do mecanismo de interferência por RNA.....	69
Figura 5- Gel representativo da quantificação das fitas de RNA.....	75
Figura 6- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.....	83
Figura 7- Curva padrão de hidroxiprolina.....	87
Figura 8- Padronização da reação de RT-PCR para a expressão dos genes de β -MHC e GAPDH em corações de camundongos.....	89
Figura 9- Ensaio dose-resposta para siRNA _{FAK}	96
Figura 10- Padronização da injeção de siRNA em camundongos.....	97
Figura 11- Injeção hidrodinâmica de siRNA _{FAK} via veia caudal em camundongos.....	98
Figura 12- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK no miocárdio de camundongos.....	100
Figura 13- Silenciamento do gene da FAK em células cardíacas isoladas de camundongos.....	102
Figura 14- Avaliação de <i>off-targets</i> de siRNA _{FAK} no coração de camundongos.....	104

Figura 15-	Dosagem de interferon gama circulante no plasma de camundongos tratados com siRNA _{FAK} ou siRNA _{GFP} nos vários períodos experimentais.....	105
Figura 16-	Curva de crescimento de camundongos tratados com siRNA _{FAK} ou siRNA _{GFP} por diferentes períodos experimentais.....	106
Figura 17-	Curso temporal do silenciamento do gene da FAK em diferentes órgãos.....	107
Figura 18-	Análise hemodinâmica de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.....	110
Figura 19-	Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.....	112
Figura 20-	Análise morfométrica e histológica do VE de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.....	113
Figura 21-	Modelo de coarctação da aorta em camundongos Swiss –FAK....	115
Figura 22-	Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA _{FAK} anterior à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.....	118
Figura 23-	Avaliação da atividade da FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos a 7 dias de coarctação da aorta.....	119
Figura 24-	Análise hemodinâmica de camundongos Swiss tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} anterior à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.....	123
Figura 25-	Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos à coarctação da aorta por diversos períodos experimentais.....	125

Figura 26-	Curva de crescimento de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} previamente à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.....	126
Figura 27-	Avaliação da expressão de β -MHC no miocárdio de animais tratados com siRNA _{FAK} ou siRNA _{GFP} e submetidos a coarctação da aorta por diversos períodos experimentais.....	128
Figura 28-	Análise morfométrica do VE de camundongos Swiss tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos à coarctação da aorta por diversos períodos experimentais.....	129
Figura 29-	Exemplos representativos de secções histológicas de corações provenientes de camundongos coarctados tratados previamente com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e coradas com Tricrômico de Masson.....	131
Figura 30-	Análise quantitativa das áreas de fibrose no miocárdio de camundongos tratados previamente com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos a coarctação da aorta.....	132
Figura 31-	Análise do conteúdo de hidroxiprolina no VE de camundongos tratados previamente com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos a 1 semana de sobrecarga pressórica.....	133
Figura 32-	Avaliação da atividade de MMP-2 no miocárdio de animais pré-tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e coarctados por 5 dias.....	134
Figura 33-	Avaliação da expressão de FAK e MMP-2 em fibroblastos isolados provenientes de camundongos pré-tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e coarctados por 7 dias.....	136
Figura 34-	Curso temporal do silenciamento do gene da FAK no VE hipertrófico de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK}	138

Figura 35-	Análise hemodinâmica de camundongos Swiss com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e acompanhados por diversas semanas.....	141
Figura 36-	Análise ecocardiográfica de corações hipertróficos de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e acompanhados por diversas semanas.....	143
Figura 37-	Curva de crescimento de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK}	144
Figura 38-	Avaliação da expressão de β -MHC no VE hipertrófico de camundongos com tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e acompanhados por diversas semanas.....	145
Figura 39-	Análise morfométrica do VE hipertrófico de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK}	146
Figura 40-	Exemplos representativos de corações provenientes de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e corados com Tricrômico de Masson.....	148
Figura 41-	Análise quantitativa das áreas de fibrose no VE de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK}	149
Figura 42-	Curva de mortalidade de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} em diferentes períodos experimentais.....	150

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Figura 7- Curva padrão de hidroxiprolina.....	87
Figura 9B- Ensaio dose-resposta: Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos.....	96
Figura 10B- Padronização da injeção: Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos.....	97
Figura 12B- Curso temporal do silenciamento da FAK: Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongo.....	100
Figura 12D- Valores médios da quantidade de RNAm de FAK normalizada pela quantidade de RNA ribossômico 18S em miocárdio de camundongos.....	100
Figura 13B- Cardiomiócitos isolados: Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em cardiomiócitos isolados de corações de camundongos adultos.....	102
Figura 13D- Fibroblastos isolados: Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de vimentina em fibroblastos isolados de corações de camundongos adultos.....	102
Figura 15- Dosagem de interferon gama circulante no plasma de camundongos tratados com siRNA _{FAK} ou siRNA _{GFP} nos vários períodos experimentais.....	105

Figura 16-	Curva de crescimento de camundongos tratados com PBS ou siRNA _{FAK} por diferentes períodos experimentais.....	106
Figura 17B-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de ERK ½ em pulmão de camundongos.....	107
Figura 17D-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de ERK ½ em rim de camundongos.....	107
Figura 17F-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de ERK ½ em fígado de camundongos.....	107
Figura 18A-	Gráfico de barras indica os valores médios de pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS _{CT}).....	110
Figura 18B-	Gráfico de barras indica os valores médios de pressão arterial sistólica aferida na femoral(PAS _{FE}).....	110
Figura 18C-	Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico.....	110
Figura 19A-	Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE do VE de camundongos com cirurgia fictícia (CT) ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta.....	112
Figura 19B-	Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE do VE...	112
Figura 19C-	Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE do VE...	112
Figura 19D-	Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS do VE.....	112
Figura 20A-	Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia (CT) ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta.....	113

Figura 20B-	Gráfico de barras indica os valores médios percentuais da densidade de interstício do VE.....	113
Figura 21A-	Gráfico indica os valores médios da razão da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em miocárdio de camundongos.....	115
Figura 22B-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos.....	118
Figura 22D-	Valores médios da quantidade de RNAm de FAK normalizada pela quantidade de RNA ribossômico 18S em miocárdio de camundongos.....	118
Figura 23B-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em miocárdio de camundongos.....	119
Figura 24A-	Gráfico de barras indica os valores médios de PAS _{CT} (Pressão arterial sistólica aferida na carótida).....	123
Figura 24B-	Gráfico de barras indica os valores médios de PAS _{FE} (Pressão arterial sistólica aferida na femoral).....	123
Figura 24C-	Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico.....	123
Figura 25A-	Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE do VE..	125
Figura 25B-	Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE do VE...	125
Figura 25C-	Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE.....	125
Figura 25D-	Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS..	125
Figura 26-	Curva de crescimento de camundongos tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} previamente à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.....	126

Figura 27B-	Valores percentuais médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH.....	128
Figura 28-	Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta.....	129
Figura 30-	Análise quantitativa das áreas de fibrose no miocárdio de camundongos tratados previamente com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos a coarctação da aorta.....	132
Figura 31-	Análise do conteúdo de hidroxiprolina no VE de camundongos tratados previamente com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} e submetidos a sobrecarga pressórica.....	133
Figura 32B-	Valores percentuais médios de atividade zimográfica de MMP-2.....	134
Figura 33B-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK ou MMP-2 normalizadas pela quantidade de vimentina no VE de camundongos.....	136
Figura 34B-	Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos.....	138
Figura 35A-	Gráfico de barras indica os valores médios de PAS _{CT} (Pressão arterial sistólica aferida na carótida).....	141
Figura 35B-	Gráfico de barras indica os valores médios de PAS _{FE} (Pressão arterial sistólica aferida na femoral).....	141
Figura 35C-	Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico.....	141

Figura 36A-	Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE (diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo) do VE.....	143
Figura 36B-	Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE (diâmetro sistólico final do VE) do VE.....	143
Figura 36C-	Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE (espessura da parede do ventrículo esquerdo).....	143
Figura 36D-	Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS (% , fração de encurtamento) do VE.....	143
Figura 37-	Curva de crescimento de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA.....	144
Figura 38B-	Valores percentuais médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH.....	145
Figura 39-	Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia ou com 1 a 12 semanas após a administração de siRNA.....	146
Figura 41-	Análise quantitativa das áreas de fibrose no VE de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA.....	149
Figura 42-	Curva de mortalidade de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA _{GFP} ou siRNA _{FAK} em diferentes períodos experimentais.....	150

RESUMO

Doenças do coração cursam frequentemente com hipertrofia do miocárdio. Estímulos mecânicos e neuro-humorais são sinalizadores críticos para o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos nos vários processos patológicos. Neste contexto, estudos indicam que a quinase de adesão focal (FAK), uma proteína tirosino-quinase que participa dos mecanismos de sinalização por integrinas, é uma mediadora importante do crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo (VE). Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da FAK na indução da hipertrofia e na deterioração do VE induzidas por sobrecarga pressórica crônica em camundongos através de estratégia de interferência por RNA. A coarctação da aorta em camundongos induziu a hipertrofia do VE acompanhada pelo aumento da expressão e atividade da FAK no miocárdio. A infusão de siRNA específico para FAK (siRNA_{FAK}), via veia jugular, levou ao silenciamento gênico prolongado da FAK (~70%) no VE normal e também no hipertrófico. O *knockdown* da FAK foi confirmado nos miócitos e fibroblastos cardíacos provenientes do VE de camundongos. O silenciamento da FAK foi acompanhado tanto da prevenção como regressão da hipertrofia do VE. A função do VE foi preservada e a taxa de sobrevivência foi maior nos camundongos tratados com siRNA_{FAK}, apesar da persistência da sobrecarga pressórica. Estes achados foram paralelos a atenuação do crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos e da expressão do marcador de hipertrofia β -MHC no VE sob sobrecarga pressórica. O silenciamento da FAK também atenuou o aumento da fibrose intersticial, conteúdo de colágeno e atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) no VE submetido ao estímulo mecânico. Em fibroblastos extraídos de corações hipertróficos, o silenciamento da FAK foi concomitante à diminuição da expressão de MMP-2. Assim, estes dados indicam que a sinalização mediada pela FAK é necessária não apenas para o desenvolvimento, mas também para sustentar a hipertrofia em resposta a sobrecarga pressórica crônica.

ABSTRACT

Hypertrophy is a critical event in the onset of failure in chronically overloaded hearts. Mechanical stress and neurohumoral factors signaling factors have been considered the main triggering stimuli for the installation of hypertrophy in cardiac myocytes in a variety of pathological process. In this context, focal adhesion kinase (FAK), a key protein of the integrin signaling pathway, has attracted particular attention as a mediator of hypertrophy induced by increased load. This study was performed to address the influence of FAK in the pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure induced by chronic pressure overload in mice using RNA interference methodology. Aortic constriction in mice induced left ventricle (LV) hypertrophy and increased expression and phosphorylation of FAK. Intrajugular delivery of specific small interfering RNA induced prolonged FAK silencing (~70%) in both normal and hypertrophic LVs. Studies in cardiac myocytes and fibroblasts harvested from LVs confirmed the ability of the systemically administered specific small interfering RNA to silence FAK in both cell types. Myocardial FAK silencing was accompanied by prevention, as well as reversal, of load-induced left ventricular hypertrophy. The function of LVs was preserved and the survival rate was higher in banded mice treated with small interfering RNA targeted to FAK, despite the persistent pressure overload. Further analysis indicated attenuation of cardiac myocyte hypertrophic growth and of the rise in the expression of β -myosin heavy chain in overloaded LVs. Moreover, FAK silencing was demonstrated to attenuate the rise in the fibrosis, collagen content, and activity of matrix metalloproteinase-2 in overloaded LVs, as well as the rise of matrix metalloproteinase-2 protein expression in fibroblasts harvested from overloaded LVs. This study indicate that FAK is necessary not only to the development but also to sustain LV hypertrophy in response to chronic pressure overload.

1- INTRODUÇÃO

Apesar do progresso na prevenção e tratamento da maioria das formas de doenças cardiovasculares, a incidência e prevalência da insuficiência cardíaca tem aumentado significativamente nos últimos anos. As doenças cardíacas geralmente são acompanhadas pela hipertrofia cardíaca, que pode ser considerada um estágio inicial da insuficiência cardíaca. A hipertrofia do miocárdio e sua progressão para a falência cardíaca são determinadas principalmente pelo aumento da sobrecarga hemodinâmica, o que ocasiona hipertrofia e injúria dos cardiomiócitos. Evidências indicam que o citoesqueleto dos miócitos cardíacos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos. Por conectarem o citoesqueleto às proteínas da matriz extracelular, as integrinas são consideradas os sensores bioquímicos em potencial para o estresse mecânico nos cardiomiócitos. Neste contexto, FAK (quinase de adesão focal), uma proteína central na cascata de sinalização das integrinas, tem recebido atenção como um mediador em potencial das respostas do miócitos cardíacos ao estímulo hipertrófico.

1.1- Insuficiência cardíaca

A partir da última década do século XX, a insuficiência cardíaca tornou-se um dos principais problemas em saúde pública. A estatística brasileira mostra que, em 2005, 315.396 pessoas eram portadoras de insuficiência cardíaca, com mortalidade de 7,7% entre os pacientes hospitalizados por esta síndrome (Data SUS).

A insuficiência cardíaca é vista como uma doença hemodinâmica na qual a redução da performance de bomba do coração ocasiona o aumento das pressões pulmonar e venosa sistêmica, retenção de fluídos e diminuição do débito cardíaco (KATZ, 2003). Mecanismos compensatórios surgem na tentativa de aumentar o débito cardíaco, como o aumento da frequência cardíaca, da pressão diastólica final e da massa ventricular. Neste contexto, a hipertrofia cardíaca representa o fenótipo central através do qual é realizada a compensação cardíaca a diferentes estímulos. Contudo, com a evolução da doença, esta resposta adaptativa parece ser o primeiro passo para a subsequente deterioração funcional e estrutural do coração, que culmina na falência cardíaca. (SELVETELLA et al., 2004).

1.2- Hipertrofia cardíaca

A palavra hipertrofia tem origem do grego *hyper* (hiper) e *trophy* (crescimento) e é definida como “o aumento ou supercrescimento de um órgão ou parte devido ao aumento do tamanho de suas células constituintes” (TAYLOR et al., 1988).

1.2.1- Patogênese da hipertrofia cardíaca

A hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) é a resposta do miocárdio a vários estímulos patológicos e fisiológicos, mecânicos e hormonais, que causam aumento de trabalho sob condições de aumento de demanda. A hipertrofia cardíaca é um aspecto comum das doenças cardiovasculares que causam o estiramento das câmaras cardíacas. Ela pode ser induzida por sobrecarga de volume (por exemplo, regurgitação da válvula mitral crônica, insuficiência valvular, fistula arteriovenosa, *shunts* intracardíacos), sobrecarga pressórica (por exemplo, hipertensão sistêmica, estenose das válvulas, coarctação da aorta) ou injúrias do miocárdio (por exemplo, isquemia, infarto, toxinas, infecção, síndrome metabólica genética) (DIWAN & DORNII, 2007).

A presença da hipertrofia cardíaca, independentemente da doença primária que a tenha originado, é um fator de grande impacto na evolução clínica e prognóstico de pacientes cardiopatas (LEVY et al., 1990; ST. JOHN et al., 1994).

1.2.2- Tipos de hipertrofia cardíaca

Quando submetido à sobrecarga hemodinâmica, o coração modifica sua geometria e volume em resposta ao aumento de demanda. Sendo os cardiomiócitos células terminalmente diferenciadas, as adaptações ao aumento de demanda são acompanhadas, principalmente, pelo crescimento hipertrófico, que resulta em remodelamento hipertrófico das câmaras (SELVETELLA et al., 2004). Classicamente, dois tipos diferentes de fenótipos hipertróficos podem ser distinguidos: (1) hipertrofia concêntrica devido a sobrecarga pressórica, caracterizada pela adição em paralelo de sarcômeros e crescimento lateral dos cardiomiócitos individuais; (2) hipertrofia ecêntrica devido à sobrecarga de volume ou

anterior ao infarto do miocárdio, caracterizada pela adição em série dos sarcômeros e crescimento celular longitudinal.

Na década de 60, Meerson e colegas classificaram a transformação hipertrófica concêntrica do coração em 3 estágios: (1) desenvolvimento da hipertrofia, onde a sobrecarga excede o débito cardíaco, (2) hipertrofia compensatória, onde a razão demanda/massa é normalizada e o débito cardíaco é mantido, (3) insuficiência cardíaca, com dilatação ventricular e declínio progressivo do débito cardíaco apesar da ativação contínua do programa hipertrófico.

1.2.3- Hipertrofia cardíaca concêntrica compensada

Do ponto de vista funcional, inicialmente a hipertrofia cardíaca tem caráter compensatório, preservando a performance cardíaca sob condições de sobrecarga hemodinâmica. Este mecanismo adaptativo é melhor exemplificado nos casos de hipertrofia em resposta a sobrecarga pressórica. Neste caso, a função sistólica cardíaca é preservada pelo aumento da espessura da parede das câmaras, o que resulta em normalização da tensão da parede, de acordo com a lei de Laplace. Este conceito para o VE é ilustrado na Figura 1.

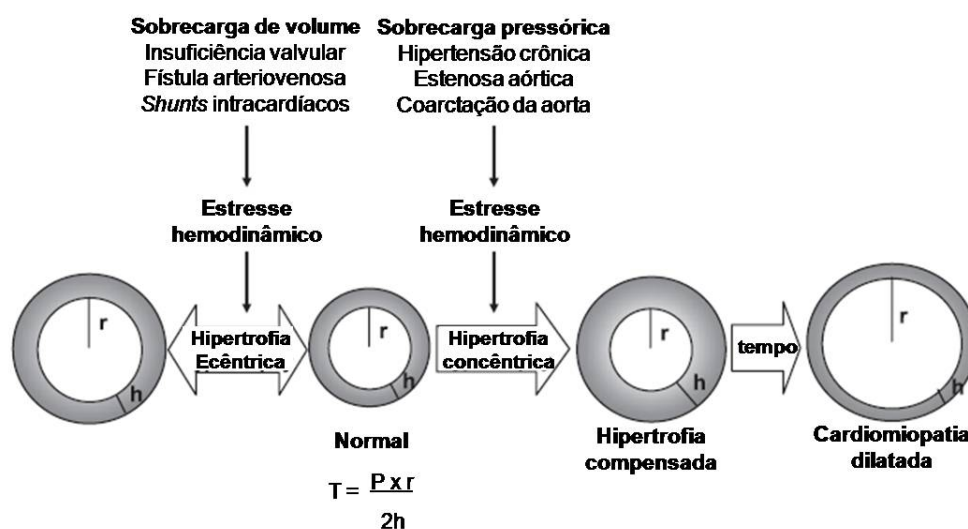


Figura 1- Hipertrofia cardíaca em resposta a diversos estímulos (modificado de DORN II, 2007).

No nível celular, o crescimento hipertrófico inicial reflete o aumento de massa dos cardiomiócitos, decorrente do aumento da síntese de proteínas do citoesqueleto, proteínas do ribossomo e proteínas sinalizadoras requeridas pelos cardiomiócitos para síntese protéica e crescimento estrutural, levando ao aumento da sarcomerogênese (KONG et al., 2005). O crescimento hipertrófico também é acompanhado por alterações estruturais na matriz extracelular, caracterizadas pelo aumento da expressão gênica de colágeno e outras proteínas de matriz, associadas a fibrose (WEBER, 2000; HIROTSOU et al., 2006).

No nível molecular, diversas alterações específicas na expressão gênica dos cardiomiócitos são características da hipertrofia cardíaca. A resposta inicial dos cardiomiócitos a estímulos hipertróficos inclui a ativação coordenada e rápida dos genes de resposta imediata (*c-jun*, *c-fos* e *egr*) (IWAKI et al., 1990) e aumento da síntese protéica, seguido pela reexpressão de genes fetais (ANF e β -MHC) (KOVACIC-MILIVOJEVIC et al., 2001). Há o aumento da expressão gênica de BNP, enzima conversora de angiotensina (ECA) e receptor quinase β -adrenérgico, os quais pertencem a um grupo de efetores ou reguladores da sinalização para vias neuro-humorais, implicadas na transdução de estímulos de estresse mecânico em eventos de sinalização humoral (IEMITSU et al., 2001). Também há o aumento da expressão de genes envolvidos com a resposta inflamatória (KONG et al., 2005).

Em algum momento, uma variedade de eventos metabólica ou energeticamente desfavoráveis ocorrem na hipertrofia cardíaca, incluindo mudanças nas isoformas das proteínas contráteis (SCHEUER et al., 1982), diminuição da razão de mitocôndrias para o número de cardiomiócitos (TOMANEK et al., 1979; LEONG et al., 2003) e mudanças no consumo normal de ácidos graxos para o uso de glicose como o substrato energético primário do miocárdio (ALLARD et al., 1994).

A expressão cardíaca da isoforma de MHC correlaciona-se diretamente com a contratilidade muscular. O aumento da expressão de β -MHC pode servir como um marcador de hipertrofia cardíaca precoce e sensível. Apesar de β -MHC ser um filamento lento, ela pode gerar mais força de contração dos filamentos com alta economia no consumo de energia, em relação a α -MHC. Isto sugere que a mudança da forma α - para β -

MHC pode representar um processo adaptativo para preservar a energia no coração hipertrófico. Por outro lado, a contratilidade deprimida contribui significativamente para o início e progressão da insuficiência cardíaca (KRENZ & ROBBINS, 2004).

1.2.4- Descompensação da hipertrofia cardíaca

Em longo prazo, mantida a sobrecarga hemodinâmica, a hipertrofia compensada progride para a descompensação ou remodelamento maladaptativo, caracterizado por anomalias estruturais e funcionais das câmaras, resultando clinicamente em insuficiência cardíaca. Este estágio é acompanhado por uma dilatação ventricular progressiva e diminuição na espessura da parede do VE, o que resulta no aumento da tensão na parede e disfunção sistólica, como ilustrado na Figura 1 (DORN II, 2007).

No nível celular, a descompensação da hipertrofia cardíaca é acompanhada pela mudança de crescimento para morte celular. Os cardiomiócitos são substituídos rapidamente por tecido fibroso, diminuindo a performance contrátil cardíaca e resultando em disfunção sistólica. Ressalta-se que os eventos celulares irreversíveis na descompensação da hipertrofia são a degeneração e a morte dos cardiomiócitos, a qual pode ocorrer por necrose, apoptose ou autofagia (DIWAN & DORN, 2007).

A necrose do cardiomiócito é a via postulada mais antiga para a morte celular na hipertrofia cardíaca descompensada. A hipótese mais aceita para este evento é a do núcleo isquêmico, uma vez que o oxigênio não se difunde adequadamente dos capilares adjacentes ao centro do cardiomiócito hipertrófico, levando a hipóxia das mitocôndrias, o que resulta na diminuição da produção de ATP e depressão da contratilidade (VATNER, 1988; SHIOJIMA et al., 2001).

A apoptose é um evento que ocorre raramente em condições normais no miocárdio, uma vez que este é um tecido sem capacidade de regeneração. Estudos mostraram a indução de genes pró-apoptóticos no miocárdio hipertrófico de humanos e camundongos, indicando que o programa gênico da apoptose pode ser induzido pela hipertrofia cardíaca (YUSSMAN et al., 2002, HEIN et al., 2003).

Autofagia é um componente essencial no processo de degradação das organelas e proteínas celulares pela via do lisossomo. Em condições aceleradas de síntese e degradação de proteínas, como nos cardiomiócitos hipertróficos submetidos à sobrecarga hemodinâmica, o processo proteolítico é exarcebado, perturbando a função basal e resultando na morte celular (SCHAPER et al., 1991; SHIMOMURA et al., 2001).

A descompensação da hipertrofia cardíaca também é acompanhada pela redução da angiogênese coronária em relação ao crescimento dos cardiomiócitos. Isto resulta no decréscimo relativo na densidade de capilares miocárdicos e na redução absoluta da disponibilidade de oxigênio por unidade de miocárdio, promovendo morte celular e acelerando o remodelamento (HUDLICKA et al., 1992)

No nível molecular, o perfil de expressão gênica na hipertrofia descompensada/insuficiência cardíaca é a exacerbação da expressão gênica observada na hipertrofia compensada, com a inclusão dos fatores apoptóticos (KONG et al., 2005). Há o aumento da expressão gênica de proteínas da matriz extracelular e diminuição da expressão de genes metabólicos, especialmente aqueles envolvidos no metabolismo de ácidos graxos. (MIROTSOU et al., 2006).

Além disso, a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca é associada a perturbações funcionais da homeostase de Ca^{2+} celular (BERS, 2002) e correntes iônicas (ARMOUNDAS et al., 2001; HILL, 2003), as quais predisõem a disfunção ventricular e arritmias. Há a diminuição da expressão gênica de SERCA2a, diminuindo a capacidade de transporte de cálcio pelo retículo endoplasmático e, assim, a contratilidade cardíaca (ARAI et al., 1994). O aumento de Ca^{2+} intracelular ativa calcineurina, mediado pela proteína adaptadora calmodulina, levando a ativação do fator de transcrição NFAT e a expressão gênica pró-hipertrófica. Molkenstein et al. (1998) mostraram o desenvolvimento precoce de hipertrofia cardíaca e subsequente insuficiência em camundongos transgênicos que superexpressavam calcineurina.

Outro fator marcante do remodelamento cardíaco é o acúmulo de colágeno fibrilar do tipo I, relacionado a fibrose intersticial difusa, focal e perivascular. Como resultado, o miocárdio torna-se menos complacente, prejudicando a contração e o

relaxamento do VE (WEBER & BRILLA, 1992). Neste contexto destaca-se o envolvimento de metaloproteases (MMPs), enzimas proteolíticas envolvidas no remodelamento da matriz extracelular. As gelatinases MMP-2 e MMP-9 são expressadas constitutivamente tanto por fibroblastos como por miócitos cardíacos e possuem expressão e atividade elevadas nos corações hipertróficos e em falência de roedores e humanos, indicando sua implicação no remodelamento miocárdico (SPINALE, 2002).

A expressão de MMPs no miocárdio está relacionada com a dinâmica da síntese e degradação das proteínas da matriz extracelular, resultando na fibrose do VE submetido à sobrecarga hemodinâmica. O aumento da atividade de MMPs causa a proteólise dos componentes da matriz extracelular, facilitando o processo pró-fibrótico, uma vez que libera moléculas com efeitos em potencial na síntese de matriz, como fatores biológicos ativos e matricinas, as quais estimulam a formação de tecido conjuntivo novo (LI et al., 2000). Além disso, MMPs estão envolvidas na invasão tecidual por células inflamatórias, como macrófagos. Quando estas células alcançam o miocárdio, elas liberam mediadores, como TNF- α e TGF- β , os quais, por sua vez estão envolvidos na hipertrofia dos cardiomiócitos e na ativação dos fibroblastos cardíacos, levando a secreção de proteínas da matriz celular e fibrose (PANEK & BADER, 2006).

1.3- Sinalização a estímulos hipertróficos

Crescimento muscular e adaptação são processos complexos. As evidências disponíveis indicam que os estímulos mecânicos resultantes das sobrecargas hemodinâmicas são os fatores mais importantes na patogênese da hipertrofia dos cardiomiócitos (COOPER, 1997). No entanto, além de estímulos mecânicos, postula-se que fatores de natureza neural e humoral também contribuem para o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos (SADOSHIMA & IZUMO, 1997). Estímulos hipertróficos mecânicos e neurohumorais convergem em módulos de sinalização intracelular múltiplos que medeiam a resposta de hipertrofia cardíaca (Figura 2). Estas vias de sinalização incluem moléculas intermediárias e fatores de transcrição responsáveis e coordenam diretamente o crescimento hipertrófico pela alteração da expressão gênica no núcleo e pelo aumento da taxa de

tradução e diminuição da degradação das proteínas no citoplasma (HEINEKE & MOLKENTIN, 2006). Um grande número de vias de sinalização intracelulares envolvidas na resposta cardíaca a estímulos mecânicos foi caracterizado, entre elas calcineurina, proteína G, PKA, PKC, MAPK-ERK 1/2, JNK, p38 e PI3K-AKT (SELVETELLA & LEMBO, 2005; DORN II, 2007).

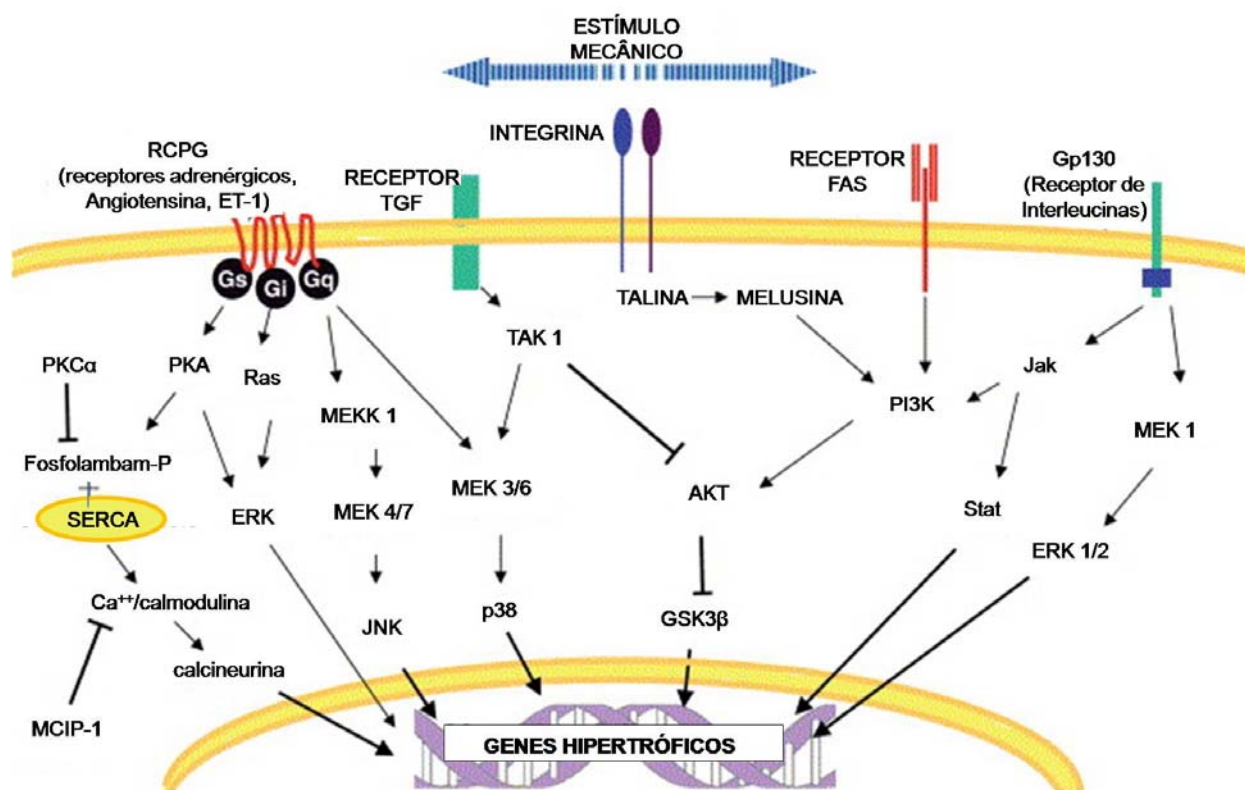


Figura 2- Esquema representativo da sinalização intracelular envolvida na hipertrofia cardíaca (SALVATELLA & LEMBO, 2005).

1.3.1- Estímulos neuro-humorais

Mediadores neurohumorais estão envolvidos na estimulação do crescimento cardíaco. O aumento da sobrecarga hemodinâmica causa a liberação e secreção de mediadores neurohumorais, como fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que contribuem para a complexidade da resposta hipertrófica cardíaca. Dentre estes fatores citam-se: norepinefrina, endotelina-1, angiotensina II, bFGF, IGF, TGB- β , citocina interleucina-6 (SELVETELLA & LEMBO, 2005; HEINEKE & MOLKENTIN, 2006).

1.3.2- Estímulos mecânicos

Os cardiomiócitos possuem um mecanismo intrínseco sensível a força mecânica que acopla o estresse mecânico a indução de vias de sinalização intracelulares responsáveis pela resposta hipertrofica. Os cardiomiócitos em cultura sofrem hipertrofia quando submetidos ao estiramento mecânico *in vitro* (SADOSHIMA & IZUMO, 1997; TORSONI et al., 2003). Contudo, as moléculas que participam da mecanotransdução cardíaca não são completamente conhecidas.

Evidências obtidas em modelos experimentais e em formas específicas de miocardiopatia de origem genética indicam que o citoesqueleto dos miócitos cardíacos tem função importante na transdução de eventos mecânicos em eventos bioquímicos (SUSSMAN et al., 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003). O citoesqueleto dos miócitos cardíacos inclui estruturas sarcoméricas e extra-sarcoméricas (SCHAPER et al., 1991; CLARK et al., 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003).

Dentre as estruturas sarcoméricas citam-se proteínas que conectam os filamentos contráteis à linha Z e a própria linha Z. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui filamentos de actina e filamentos intermediários que conectam sarcômeros entre si, com o sarcolema e com membranas de organelas intracelulares. O citoesqueleto extra-sarcomérico inclui os microtúbulos, que estabelecem conexões longitudinais entre as estruturas sub-celulares dos miócitos cardíacos (SCOPACASA et al., 2003).

Como sustentam e ancoram as estruturas sub-celulares, as proteínas do citoesqueleto sofrem tensão e se deformam podendo servir como transdutores de força nos miócitos cardíacos (SUSSMAN et al., 2002; EPSTEIN & DAVIS, 2003). Também importante, no contexto da mecano-transdução, é a capacidade do citoesqueleto de ancorar e modular a atividade de moléculas sinalizadoras que, uma vez ativadas, podem coordenar a expressão gênica e as respostas fenotípicas a estímulos mecânicos (BURRIDGE & CHRZANOWASKA-WODNICKA, 1996; JANMEY, 1998).

As integrinas são receptores heterodiméricos transmembrânicos que conectam o citoesqueleto à matriz extracelular. Localizam-se principalmente nas adesões focais da matriz extracelular com os discos Z dos cardiomiócitos, em estruturas denominadas

costâmeros. Como consequência, as integrinas são consideradas os sensores bioquímicos em potencial para o estresse mecânico nos miócitos cardíacos (BRANCACCIO et al., 2006). Neste contexto, Ross et al., 1998, mostraram que a superexpressão de integrinas $\beta 1$ em cardiomiócitos induz a expressão do programa gênico hipertrófico. Em corroboração, a inativação da função das integrinas em camundongos transgênicos adultos, pela metodologia de Cre recombinase, resulta na intolerância à sobrecarga hemodinâmica, causando disfunção sistólica e falência cardíaca (SHAI et al., 2002).

1.3.3- Quinase de adesão focal (FAK)

A quinase de adesão focal (FAK), uma proteína tirosino quinase citossólica, localiza-se predominantemente nos sítios de adesão focal das células ao substrato. Sua descoberta no início dos anos 90 foi a chave para o entendimento de que as integrinas não são simples proteínas de adesão mas também receptores potentes de sinalização celular. Por ser originalmente descrita como um componente central da via de sinalização regulada pelas integrinas, a FAK é considerada uma mediadora em potencial das respostas fenotípicas dos cardiomiócitos ao estresse mecânico e também a agonistas hipertróficos. A maioria das células e tecidos expressa FAK e ela é conservada entre os mamíferos (PARSONS, 2003). FAK é uma quinase essencial, uma vez que camundongos com depleção total da FAK exibem morte embrionária (ILIC et al., 1995).

Como ilustrado na Figura 3, a estrutura da FAK inclui um domínio NH_2 -terminal FERM, um domínio quinase central, duas regiões ricas em prolina e um domínio C-terminal de direcionamento às adesões focais. Um evento crítico na sinalização da FAK mediada pelas integrinas é a transautofosforilação do resíduo tirosina 397, criando um sítio de alta afinidade de ligação aos domínios SH2 da família de quinases Src. A ligação de Src no resíduo 397 da FAK promove a fosforilação de outras tirosinas da FAK, incluindo 576-577 no domínio quinase, levando a amplificação da atividade da FAK; e 925. A tirosina 925 é reconhecida como um sítio de ligação a Grb2, levando a ativação da via de MAPK (HANKS et al., 2003; PARSONS, 2003; MITRA et al., 2005).

Estudos recentes mostraram que o domínio FERM é um elemento regulatório chave. O domínio FERM parece interagir diretamente com a região central da FAK, inibindo sua atividade quinase. Com a formação da adesão, o domínio FERM pode fazer novas interações de alta afinidade com as caudas citoplasmáticas das integrinas ou outras proteínas associadas, liberando a autoinibição e permitindo a fosforilação do resíduo tirosina 397 da FAK e recrutamento da Src (Figura 2) (LIETHA et al., 2007).

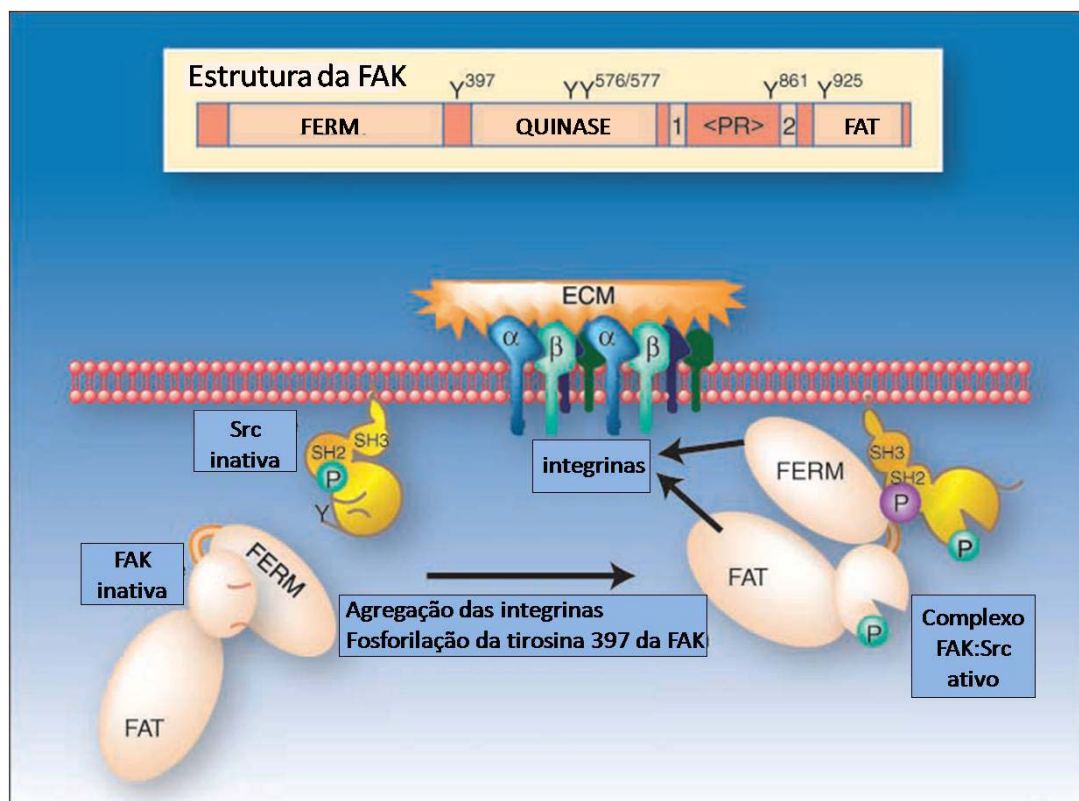


Figura 3- Estrutura linear de FAK e mecanismo proposto para a ativação do complexo FAK/Src mediado por integrinas nos sítios de adesão focal (SIESSER& HANKS, 2006).

Em adição a família de quinases Src, a tirosina 397 fosforilada da FAK pode interagir com domínios SH2 de proteínas diversas, incluindo PI3-K, PLC- γ 1, Shc, Nck-2, Grb7. A região FERM da FAK pode interagir diretamente com p53, promovendo sua degradação (LIM et al., 2008). A região rica em prolina de FAK pode se ligar ao domínio

SH3 de p130Cas, levando ao aumento da atividade de Rac, e aos domínios SH3 de dos reguladores de GTPases GRAF e GAP. A região FAT da FAK interage com proteínas associadas às integrinas, como paxilina e talina, levando a fosforilação. Desta maneira, a FAK regula a migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (HANKS et al., 2003; PARSONS, 2003; MITRA et al., 2005).

Embora a sinalização da FAK seja relacionada, principalmente, com as respostas celulares mediadas pelas integrinas, a FAK também pode ser ativada por vários fatores de crescimento, citocinas e receptores ligados a proteínas G. Na maioria destes casos, a ativação da FAK parece ser um efeito secundário resultante de outras vias de sinalização que afetam a função das integrinas. Desta maneira, a ativação da FAK parece ser um ponto de convergência para diferentes vias de sinalização, as quais propiciam mudanças no comportamento celular (SIESSER & HANKS, 2006).

Dada sua participação em processos celulares diversos, têm-se empregado grande esforço para esclarecer a função da FAK no desenvolvimento do sistema cardiovascular e nas doenças cardíacas (VADALI et al., 2007).

Estudos anteriores demonstraram que a FAK é expressa em abundância no miocárdio, sendo rapidamente ativada por sobrecarga pressórica em cultura de células ventriculares de ratos neonatos e no próprio miocárdio (FRANCHINI et al., 2000; LASER et al. 2000; BAYER et al., 2002; DOMINGOS et al., 2001; TORSONI et al., 2003). Em corações isolados, Domingos et al., 2002, verificaram que a ativação da FAK era determinada pelo estiramento passivo do miocárdio, mais do que por tensões ativas.

Em cardiomiócitos isolados, a ativação da FAK por estiramento não depende da ativação de fatores parácrinos, o que indica ser a ativação da FAK pelo estiramento dependente de mecanismo intrínseco do miócito ligado diretamente ao estímulo mecânico (TORSONI et al., 2003). Esta idéia foi confirmada por Fonseca et al., 2005, que demonstraram, através de sondagens com sistema de duplo-híbrido em levedura, ensaios de “pull-down” e imunohistoquímica, a associação direta entre a FAK com a região C-terminal da cadeia pesada de miosina, bem como a dependência desta associação para a ativação da FAK pelo estímulo mecânico em cardiomiócitos.

Esta sequência de ativação da FAK, bem como a estreita cooperação entre FAK e Src para a ativação, inicialmente demonstradas em outros tipos celulares, foi confirmada em miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos em estudos anteriores (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002; TORSONI et al., 2003).

Uma vez ativada, a FAK pode participar da regulação da re-expressão de genes fetais do programa gênico hipertrófico em resposta ao estímulo mecânico. Torsoni et al., mostraram que a ativação da FAK por estiramento em miócitos cardíacos induzia a ativação transcricional do marcador de hipertrofia ANF (2003) e β -MHC (2005). Pham et al., 2000, demonstraram que a hiperexpressão de FAK em células ventriculares de ratos neonatos mantidas em condições em meio de cultura sem soro *per se* aumentava a expressão de ANF. Além da resposta aos estímulos mecânicos, a sinalização da FAK pode participar da hipertrofia induzida por antagonistas como endotelina e fenilefrina (EBLE et al., 2000; TAYLOR et al., 2000; KOVACIC-MILIVOJEVIC, 2001).

Existe ampla constatação experimental (SCHAUB et al., 1997; HOCHIJIMA & CHIEN, 2002) de que a re-expressão do programa gênico fetal é parte essencial para o estabelecimento das modificações fenotípicas do miocárdio observadas na hipertrofia e remodelamento cardíacos. Desta forma, a demonstração da importância da FAK para a expressão de ANF em resposta ao estiramento indica o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos cardiomiócitos induzidas por estímulos mecânicos.

Apesar do conhecimento abundante da interação da FAK com outras proteínas e sua função na sinalização celular *in vitro*, ainda pouco se sabe sobre as funções da FAK *in vivo* em organismo adultos. Recentemente, a importância da sinalização da FAK no crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo provocado por estímulos mecânicos foi estudada em camundongos transgênicos, onde a expressão de FAK foi depletada em cardiomiócitos utilizando-se a tecnologia de Cre recombinase dirigida pelo promotor da miosina de cadeia leve 2v (PENG et al., 2006; DIMICHELE et al., 2006). Nestes modelos, o coração se desenvolveu normalmente e apresentou função normal em condições basais embora resultados discrepantes foram observados sob condições de sobrecarga pressórica.

Peng et al., 2006, mostraram que a indução da hipertrofia por coarctação da aorta em camundongos com depleção de FAK resultava em remodelamento maladaptativo prematuro do VE, caracterizado pela dilatação do ventrículo esquerdo, aumento da fibrose intersticial e deterioração funcional. Ainda, a coarctação induziu o aumento da expressão gênica de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca. Por outro lado, DiMichele et al., 2006, mostraram que a perda da expressão de FAK atenuava a resposta hipertrófica dos cardiomiócitos em relação à coarctação da aorta, incluindo a expressão de marcadores moleculares de hipertrofia. Estes dados, embora discrepantes, sugerem que a FAK possui papel importante na instalação da hipertrofia adaptativa cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica.

Quando DiMichele et al., 2006, avaliaram a resposta do VE dos camundongos transgênicos a sobrecarga pressórica crônica, demonstraram que a sinalização da FAK pode ser importante na prevenção da deterioração funcional cardíaca. Contudo, existem estudos que sugerem que a ativação crônica da sinalização da FAK pode contribuir para a deterioração do miocárdio, levando a insuficiência cardíaca. Bayer et al., 2002, mostraram que as anormalidades estruturais e funcionais do VE de ratos submetidos à coarctação crônica da aorta abdominal suprarenal eram paralelas ao aumento da expressão e atividade da FAK no miocárdio. Lopes et al., 2007, demonstraram a expressão elevada da FAK em biópsias de corações em falência provenientes de pacientes com regurgitação da mitral. Nestes estudos, o aumento da expressão de FAK parece ser primariamente devido à expressão nos fibroblastos, localizados nas regiões de fibrose, do que nos cardiomiócitos.

Assim, estes resultados conflitantes e as limitações impostas pela deleção de FAK restrita aos cardiomiócitos excluem um melhor entendimento da importância da sinalização da FAK na fisiopatologia complexa da hipertrofia cardíaca e sua progressão para a falência cardíaca que ocorre em resposta à sobrecarga mecânica.

A avaliação desta questão pode ser realizada através de modificação da expressão ou atividade da FAK em animais de experimentação, seja por interferência direta na expressão, seja por meios farmacológicos. Neste contexto, a técnica de interferência por RNA (iRNA), que implica na introdução de uma fita dupla de RNA na célula, tem sido utilizada como uma ferramenta altamente eficiente para a determinação da função de

gênica. Esta técnica induz a diminuição da expressão gênica pós-transcricional de maneira específica e, em alguns casos, a níveis não-detectáveis (TUSCHL & BORKHARDT, 2002; DYKXHOORN et al., 2003; PEDERSON, 2003).

Na iRNA, o alvo é o RNA mensageiro (RNAm). Como ilustrado na Figura 4, a fita dupla de RNA (siRNA, “small interfering RNA”) introduzida na célula é incorporada em um complexo multiprotéico de silenciamento induzido por RNA (*RISC*). O duplex siRNA é desfeito pela ação de uma helicase, a fita antisense permanece e guia o complexo *RISC* ao RNAm-alvo de sequência complementar. O RNAm é então clivado pela ação da nuclease Argonaute 2 e rapidamente degradado. Esta degradação diminui seletivamente a tradução do gene em proteína (DYKXHOORN et al., 2003).

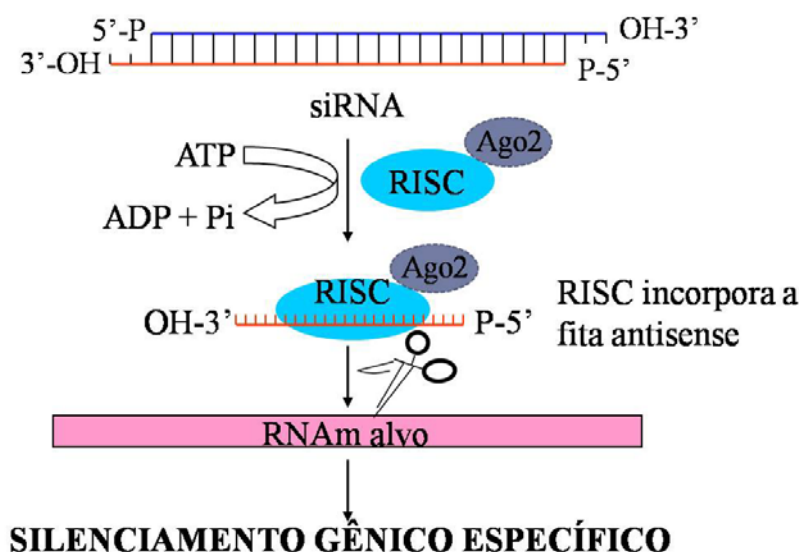


Figura 4- Esquema representativo do mecanismo de interferência por RNA.

Apesar de não existirem estudos que utilizaram iRNA para modificar a expressão da FAK em miocárdio, diversos trabalhos mostraram a redução da expressão desta proteína através de administração de iRNA específico em células tumorais (DUXBURY et al., 2003; HALDER et al., 2006; THAMILSELVAN et al., 2007; CANEL et al., 2008), indicando a aplicabilidade da técnica para a redução da expressão específica desta proteína e, portanto, seu potencial para ser utilizado como ferramenta na avaliação da

função da FAK na hipertrofia miocárdica e insuficiência cardíaca induzida por estímulo mecânico.

1.4- Hipótese

Em conjunto, evidências disponíveis indicam que a FAK comporta-se como um transdutor de estímulos biomecânicos em sinais bioquímicos no miocárdio. A sinalização mediada pela FAK é importante para a instalação da hipertrofia cardíaca adaptativa e sua progressão para a deterioração estrutural e funcional de corações submetidos à sobrecarga pressórica crônica.

1.5- Objetivos

Avaliar a influência da FAK na indução da hipertrofia e na deterioração do VE induzidas por sobrecarga pressórica crônica em camundongos através de estratégia de interferência por RNA.

Objetivos específicos:

1. Padronização do silenciamento gênico da FAK no VE de camundongos por iRNA.
2. Caracterização do modelo de hipertrofia do VE em camundongos.
3. Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com siRNA_{FAK}.
4. Avaliação do tratamento com siRNA_{FAK} da hipertrofia cardíaca instalada induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS:

Anticorpos: anti-FAK (C-20), anti-PYK2 (H-102), anti-vimentina (V-9) anti-ERK1/2 (K-23), anti-MMP-2 (H-76) policlonais da Santa Cruz Biotechnology, anti-pFAK 397 policlonal da BioSource International (USA), anti-miosina de cadeia pesada (Ab15-100) da Abcam, Inc (USA).

Reagentes: [¹²⁵I] Proteína A e [α -³²P]-dATP da Amersham; Trizol e Superscript II da Invitrogen, Colagenase tipo IA, tripsina, e hidroxiprolina da Sigma; soro fetal bovino e meio de cultura DMEM da Gibco; penicilina-estreptomicina da Nutricell.

Kits: Ampliscribe T7 high yield transcription da Epicentre, Endogen Mouse IFN γ Elisa da Pierce, Sistema Envision da Dako Envision System.

Oligonucleotídeos para síntese de siRNA: da IDT:

T7- Sequência: 5' GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG 3'

FAK236s- Sequência: 5' GCG AAA TCC ATA GCA GGC CAC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

FAK236as- Sequência: 5' ACG TGG CCT GCT ATG GAT TTC TAT AGT GAG TCG TAT TAC C 3'

GFPs- Sequência: 5' GTG TCT TGT AGT TCC CGT CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'

GFPas- Sequência: 5' ATG ACG GGA ACT ACA AGA CAC CTA TAG TGA GTC GTA TTA CC 3'

Oligonucleotídeos para RT-PCR: da IDT:

GAPDH s- Sequência: 5' GGC ATT GCT CTC AAT GAC AA 3'

GAPDH as- Sequência: 5' AGG GTG CAGH GGA ACT TTA TT 3'

β -MHC s- Sequência: 5' GCC AAC ACC AAC CTG TCC AAG GTT C 3'

β -MHC as- Sequência: 5' TGA AAA GGC TCC AGG TCT GAG GGC 3'

FAKs- Sequência: 5' ATG TTC TGG TGT CCT CAA ATG 3'

FAK as- Sequência: 5' GAG GTA AAA CGT CGA AAA ATT G 3'

Animais: Camundongos Swiss machos de 6-8 semanas, pesando entre 20-30g, provenientes do Centro de Bioterismo da Unicamp.

2.1- Desenho de siRNA_{FAK}

O siRNA contra o RNAm do gene da FAK de camundongos foi desenhado com a auxílio do software desenvolvido por Tiago Campos Pereira e Iscia Lopes-Cendes (FCM, Unicamp). Para gerar as sequências *in silico*, este software utiliza parâmetros de estabilidade interna, descritos originalmente por Khvorova et al.(2003). Desta maneira, as sequências foram selecionadas de acordo com a tendência máxima de incorporação da fita antisenso no complexo RISC. Uma vez que a eficiência de silenciamento de siRNAs é variável, diversas sequências de siRNAs foram obtidas tendo como alvo diferentes regiões do RNAm da FAK. Para os experimentos, a sequência com maior probabilidade de *knockdown* o gene da FAK de acordo com a análise *in silico* foi escolhida.

2.2- Síntese de Sirna *in vitro*

Para a síntese de siRNA_{FAK}, foi utilizado um molde de DNA correspondente a posição 236 no RNAm do gene da FAK de camundongo (AB030035), cuja sequência é apresentada em Materiais (página 50). Como controle foi utilizado siRNA sintetizado a partir de uma sequência irrelevante (GFP), sem homologia com genes de camundongo. A síntese *in vitro* do siRNA_{FAK} e siRNA_{GFP} foi realizada sob domínio do promotor da RNA polimerase III T7, utilizando o kit Ampliscribe T7 high yield transcription (Epicentre), de acordo com o protocolo do fabricante. 1 μ L dos RNAs e 1 e 3 μ g de T7, utilizados como padrão para a quantificação, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% com

brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), e visualizados com luz UV.

As bandas dos géis foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion, e a concentração dos RNAs foi determinada com base no padrão de T7, como mostra o gel representativo da Figura 4.



Figura 5- Gel representativo da quantificação das fitas de RNA. T7= promotor da RNA polimerase III (padrão de quantificação), FAKs = fita de RNA FAK senso, FAK as = fita de RNA FAK antisense.

Após quantificação, quantidades iguais, em µg, das fitas senso e antisense foram incubadas por 5 minutos a 95°C e aneladas por resfriamento lento por 12 horas. O siRNA resultante foi armazenado a -20°C.

2.3- Modelo animal

2.3.1- Injeção na veia caudal de camundongos

O método de transfecção hidrodinâmica, descrito em Zhang et al. (1999) foi empregado neste grupo. Para tanto, 15µg de siRNA_{FAK} dissolvidos em um volume de PBS correspondente a 10% da massa do animal foram rapidamente injetados na veia caudal do camundongo previamente anestesiados com éter. Camundongos controle foram injetados com siRNA_{GFP}.

2.3.2- Injeção na veia jugular de camundongos

Neste grupo, a solução de siRNA foi injetada na veia jugular de camundongos Swiss. Para tanto, os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina e xilazina. Em seguida, a região do pescoço foi aberta, a veia jugular direita dissecada e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE-50 estirada) por onde 300µL de solução com diferentes concentrações de siRNA foram infundidas lentamente (40µL, intervalo de 5 segundos, mais 40µL e assim por diante) no animal. Uma segunda injeção foi feita com 80µL de PBS para lavagem da cânula. Ao final da injeção a cânula foi retirada, a jugular ligada e a região da ferida cirúrgica fechada. Após a recuperação anestésica os camundongos foram acomodados em gaiolas. Animais controles foram injetados com solução siRNA_{GFP}.

2.3.3- Coarctação da aorta

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina e xilazina. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a croça da aorta foi dissecada e constricta com fio de sutura 7-0 (Dafilon, B. Braun Melsungen AG, Germany) tendo como guia uma agulha 27G. A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os camundongos foram acomodados em gaiolas. Os animais controle foram submetidos à cirurgia fictícia (sham), com abertura da cavidade torácica porém, sem constrição da croça da aorta.

2.3.4- Medida de pressão arterial

Antes da eutanásia, os camundongos foram anestesiados e submetidos à monitorização de pressão arterial e do gradiente trans-constricção da aorta através da inserção de cateteres de polietileno (PE-50 estirado) nas artérias carótida direita e femoral direita, os quais foram acoplados a transdutores de pressão COBE (Avarda, EUA). O sinal de pressão arterial foi amplificado por um amplificador GP4A Stemtech (Stemtech, USA),

acoplado a um conversor analógico-digital, conectado a um computador contendo o programa WINDAQ-PRO (DATAQ Instruments, EUA) para a monitoração hemodinâmica contínua e gravação de dados. Os registros hemodinâmicos foram realizados 1, 2, 3, 5, 6, 7, 10, 12 e 16 semanas após a coarctação da aorta.

2.3.5- Ecocardiografia

Para avaliar a função do ventrículo esquerdo, camundongos foram submetidos à ecocardiografia modo 2D-M, utilizando o aparelho Toshiba PowerVision e o transdutor linear 12 MHz. Para tanto, os animais foram anestesiados com a mistura de 5mg/kg de xilazina e 100mg/kg de cetamina, de acordo com Roth et al. (2002). O exame foi iniciado após 15 minutos da aplicação do anestésico. Cortes transversais do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, foram feitos para medida do septo, parede posterior e diâmetro diastólico no final da diástole e diâmetro sistólico no pico da sístole. Cada medida foi repetida 3 vezes com arquivo fotográfico das mesmas.

Os valores de massa (M) do ventrículo esquerdo (mg) foram calculados pela fórmula:

$$M = [(DDVE + \text{Septo} + \text{Parede posterior})^3 - DDVE^3] * 1,055$$

Os valores de fração de encurtamento (%FS) foram calculados pela fórmula:

$$\%FS = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$$

Os valores de volume de ejeção (SV, em μL) foram calculados pela fórmula:

$$SV = (DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3$$

Onde:

DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo,

DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

2.4- Coleta de sangue e dosagem de interferon γ no plasma de camundongos

Para avaliar se o siRNA provocava resposta imunogênica, representada pela expressão de interferon gama, foi feita a dosagem do mesmo no plasma de camundongos submetidos à infusão de siRNA_{FAK} após 1, 7, 15, 21 e 28 dias. Os animais controle foram tratados com siRNA_{GFP}.

Para tanto, camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com tiopental e o sangue foi coletado com capilar heparinizado pela veia retroorbital. O sangue foi depositado em eppendorfs contendo 60 μ L de heparina e incubado por 15 minutos a 37°C. Após este período, o material foi incubado por 15 minutos 4°C e centrifugado a 4°C, 3000 rpm, por 4 minutos. O plasma foi então recolhido e armazenado a -80°C. As amostras hemolizadas foram descartadas.

A dosagem de interferon γ no plasma foi feita utilizando o kit Endogen Mouse INF γ Elisa (Pierce), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante

2.5- Extrato total de proteínas

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com tiopental, a cavidade torácica aberta e o coração, pulmão, fígado e rim foram rapidamente removidos e homogeneizados em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C usando o homogeneizador tipo Polytron. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de biureto.

Após quantificação das proteínas, 400 μ L de amostra acrescida de 100 μ L de tampão de Laemmli (37,5g/L Tris-base; 2% SDS; 25% β -Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

2.6- Isolamento de cardiomiócitos de camundongos adultos

Para avaliar o silenciamento do gene da FAK nos miócitos do coração de camundongos após 24 horas da infusão de siRNA, estas células foram isoladas através de um método modificado do originalmente publicado por Fonseca et al. (2005). Os camundongos foram tratados com heparina (500UI) e anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina e xilazina. Para a perfusão retrógrada, a região do pescoço foi aberta, a aorta dissecada e introduziu-se uma cânula de polietileno (PE-50 estirada), a qual estava conectada a uma bomba de infusão (Kd Scientific). Em seguida, a cavidade torácica foi aberta e o átrio direito foi cortado, iniciando a infusão com 30mL de tampão de infusão (tampão Krebs-Henseleit modificado (118mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 1,2mM KH₂PO₄, 4,7mM KCl, 1,2mM MgSO₄, 10mM Hepes free acid, 10mM glicose) 1g/L BSA, 1mL/L heparina, 0,1mL/L insulina, 0,3 mg/mL collagenase tipo 1A (467 UI/mg)), a 2,2mL/minuto. Após este período, quando o coração encontrava-se flácido e pálido, este foi retirado do animal e picotado com tesoura, o máximo possível, em tampão Krebs-Henseleit modificado acrescido de 1mg/mL de BSA. A suspensão celular foi filtrada em gaze e as células observadas em microscópio convencional. Só foram notados cardiomiócitos, com ausência de outros tipos celulares.

Os cardiomiócitos foram sedimentados por centrifugação a 4°C, 3000 rpm, por 5 minutos. O pellet foi ressuspensionado em 10mL de meio DMEM acrescido de 10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina e transferido para placa de cultura. Após 2 horas em estufa de 5% CO₂ a 37°C, as células não aderentes correspondentes aos cardiomiócitos foram homogeneizadas em tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C pela passagem por agulha de insulina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry.

Após quantificação das proteínas, 200µL de amostra acrescida de 50µL de tampão de Laemmli (37,5g/L Tris-base; 2% SDS; 25% β-Mercaptoetanol; 10% glicerole 0,01% bromofenol), foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

2.7- Isolamento de fibroblastos de coração de camundongos adultos

Para avaliar o silenciamento do gene da FAK e a expressão de MMP-2 nos fibroblastos cardíacos de camundongos após a infusão de siRNA, estas células foram isoladas de acordo com Barreto-Chaves et al. (2001). Camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina e xilazina. O coração foi rapidamente removido, colocado em PBS gelado acrescido de antibióticos (0,5% penicilina-estreptomicina) e os ventrículos foram cortados em pequenos pedaços. Para digestão, os fragmentos foram incubados em 4mL de tampão de digestão (0,584 mg/mL collagenase 1A (467 UI/mg), 1 mg/mL tripsina, 1µg/mL BSA, 1% penicilina/estreptomicina em PBS) a 37°C, sob agitação, por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionou-se 0,5mL soro fetal bovino (SFB) e a suspensão celular foi centrifugada a 37°C, 3000 rpm, por 10 minutos. O pellet, que contém os fibroblastos, foi ressuspendido em 1mL de meio de cultura DMEM acrescido de 10% SFB, transferido para placa de cultura e mantido em estufa de 5% CO₂ a 37°C. O processo de digestão foi repetido até que todo o tecido fosse processado.

Ao final do processo de digestão, as placas de cultura foram mantidas na estufa por 2 horas, permitindo que apenas os fibroblastos adiram na placa. Após este período, o meio de cultura foi removido, a placa lavada com PBS gelado e os fibroblastos aderidos foram extraídos com tampão de extração (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM pirofosfato de sódio; 100mM fluoreto de sódio; 10mM EDTA; 10mM ortovanadato de sódio; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinina, 10% Triton-X 100) a 4°C pela passagem por agulha de insulina. Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante

utilizado para os ensaios. A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry.

Após quantificação das proteínas, 200µL de amostra acrescida de 50µL de tampão de Laemmli (37,5g/L Tris-base; 2% SDS; 25% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) foram aquecidos a 95°C por 5 minutos e armazenados em biofreezer para posterior análise das proteínas por western blotting.

2.8- Western Blotting

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 8% em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V, utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 30 minutos, a temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos anti-FAK (diluição 1:1000), anti-pFAK 397 (diluição 1:2000), anti-miosina (diluição 1:1000), anti-PYK2 (diluição 1:1000), anti-vimentina (diluição 1:1000), anti MMP-2 (diluição 1:1000), e anti-ERK1/2 (diluição 1:1000) em tampão de anticorpo (3% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4°C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com 5µCi de (30µCi/µg) em 10 ml de tampão de iodo (1% leite em pó desnatado; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) por 6 horas, em temperatura ambiente, para a imunodetecção. Após este período, as membranas foram novamente

lavadas por 15 minutos em solução basal e postas para secar a temperatura ambiente. A proteína A [125 I] ligada aos anticorpos específicos foi detectada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY).

As bandas dos filmes foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion. Na análise de expressão de FAK, foi utilizado o valor lido de FAK normalizado pelo valor de miosina (padrão interno).

2.9- Northern Blotting

Northern blotting foi realizado para avaliar a expressão de RNAm do gene da FAK em corações de camundongos após tratamento com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP}, em diversos períodos experimentais.

2.9.1- Extração de RNA de tecido cardíaco

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com tiopental, a cavidade torácica aberta e o coração rapidamente removido e congelado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando Trizol, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro a 260nm.

2.9.2- Avaliação da integridade do RNA

Após a quantificação, 0,5µg de RNA total foi submetido à eletroforese em gel desnaturante (1,2% agarose, MOPS 1x, 2,2M formaldeído em água DEPC). Cada amostra teve seu volume elevado até 5µL com água DEPC e foram adicionados 5µL de tampão de corrida MOPS 10X (0,4M ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico pH 7; 0,1M acetato de sódio e 0,01M EDTA), 9µL de 12,3M formaldeído, 25µL de formamida deionizada e 10µL de tampão de aplicação (1mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol, 50% glicerol, 0,2µg/mL brometo de etídeo). As amostras foram incubadas a 60°C por 15

minutos e aplicadas no gel. Após a corrida (5V/cm), o gel foi exposto à luz UV e fotografado.

A Figura 5 mostra um gel representativo de bandas de RNA que, quando íntegro, apresenta bandas de RNA ribossômico: 28S (4,7Kb), 18S (1,9Kb) e 4-5S (0,1-0,15Kb).

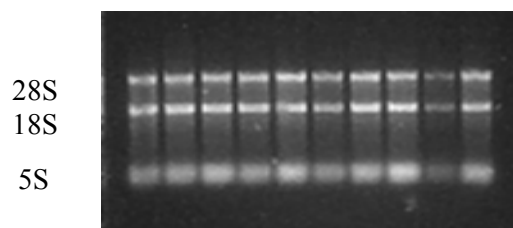


Figura 6- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.

2.9.3- Preparo da Sonda

A sonda marcada com [α - 32 P]-dATP para o RNAm da FAK (AB030035) foi gerada através da reação de RT-PCR para a FAK, utilizando primers específicos.

Para a reação de PCR foram adicionados:

- 1,5 μ L de cDNA de coração de camundongo;
- 2 μ L de 10x PCR buffer,
- 0,5 μ L de MgCl₂ 50mM,
- 3 μ L de dNTP-ATP 10mM,
- 1 μ L de [α - 32 P]-dATP,
- 1 μ L de primer S 10 μ M,
- 1 μ L de primer AS 10 μ M,
- 0,5 μ L de Taq DNA polimerase
- 9,5 μ L de água milliQ,

Foram realizados 40 ciclos de amplificação, com a temperatura de anelamento de 51°C. O amplicon de FAK gerado possuía 110pb. A reação foi incubada por 10 minutos a 95°C para desnaturar a sonda antes do uso.

2.9.4- Northern Blotting

A 15µg de RNA total dissolvidos em 11µL de água DEPC foram adicionados 5µL de tampão de corrida MOPS 10X (0,4M ácido 3-N-morfolino-propanosulfônico pH 7; 0,1M acetato de sódio e 0,01M EDTA), 9µL de 12,3M formaldeído, 25µL de formamida deionizada e 10µL de tampão de aplicação (1mM EDTA, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% xilenocianol, 50% glicerol, 0,2µg/mL brometo de etídeo). A solução foi incubada por 20 minutos a 60°C. Após breve centrifugação, as amostras de RNA foram aplicadas em gel de agarose em condições desnaturantes (1% agarose, tampão de corrida MOPS 1X, 2,2M formaldeído) e submetidas à eletroforese a 80V por aproximadamente 3 horas. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo e as bandas de RNA foram visualizadas e fotografadas com luz UV.

O RNA foi transferido para membrana de nylon Hybond (Amersham) por capilaridade em tampão SSC 10X (1,5M NaCl; 0,15M ácido cítrico pH 7) e fixado à membrana através de UV *cross-linking*. A membrana foi pré-hibridizada em solução de hibridização (50% formamida deionizada, SSC 6X, solução de Denhardt 5X [0,1% Ficoll 400, 0,1% polivinilpirrolidona, 1mg/mL albumina sérica bovina], 1% SDS e 500µg/mL de DNA de esperma de salmão desnaturado) por 6 horas a 42°C em forno de hibridização.

Aproximadamente 20ng da sonda foi desnaturada a 95°C e adicionada à solução de hibridização. A membrana foi hibridizada por 16 horas a 42°C e depois lavada em solução SSC 2X-SDS 0,5% por 15 minutos a temperatura ambiente; em solução SSC 0,1X-SDS 0,5% por 30-45 minutos a 65°C. Após a lavagem, a membrana foi envolta em uma folha de PVC e exposta a um filme Hyperfilm MP (Amersham) a -80°C por 12 horas.

As bandas dos filmes foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion. Na análise de expressão de RNAm da FAK, foi utilizado o valor lido de FAK normalizado pelo valor da banda de RNA ribossômico 18S.

2.10- Zimografia

Para avaliar a atividade de metaloproteinase 2 (MMP-2) no miocárdio ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com mistura de cetamina e xilazina, a cavidade torácica aberta e o coração foi rapidamente removido, congelado em nitrogênio líquido e homogeneizado em tampão de extração (50mM Tris-HCl pH 7.4; 0,2M NaCl, 0,1% Triton-X 100, 10mM CaCl₂ e 10μL/mL de inibidor de proteases Sigma), na proporção de 30mg tecido/ 100μL de tampão de extração, usando o homogeneizador tipo Polytron. Após 2 horas de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 4000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante foi coletado. Para aumentar o rendimento da extração de MMPs, o material insolúvel foi ressuspenso em 1/3 do volume de tampão de extração utilizado na primeira extração, aquecido a 60°C por 5 minutos e centrifugado a 4°C, 4000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e misturado ao produto da primeira extração e este material foi utilizado nos ensaios.

A determinação do conteúdo de proteínas totais das amostras foi feita pelo método de Bradford. Após quantificação das proteínas, as amostras foram diluídas em concentração final de 5μg/μL para diminuir a interferência da concentração de sais do tampão de extração na atividade das MMPs. Para os ensaios, foram utilizados 5μL de amostra (25μg de proteínas totais) acrescido de 10μL de tampão de amostra não desnaturante (0,0875M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 25% glicerol e 0,01% bromofenol)

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese SDS-PAGE em gel de acrilamida 10% acrescido de gelatina 0,1% (substrato para MMP 2) em tampão de corrida (4X: 200mM Tris-HCl; 7,18mM EDTA; 0,4% SDS; 1,52M glicina) a 100V, no gelo.

Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com tampão de lavagem (100mM Tris-HCl, 2,5% Triton-X 100) por 20 minutos a 37°C. Logo após, foi lavado duas vezes com tampão de incubação (50mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1M NaCl, 1M CaCl₂, 0,02% NaN₃) por 15 minutos a 37°C e incubado por 20-24 horas em tampão de incubação a 37°C com agitação, para desenvolver a atividade de MMPs.

Após esta incubação, o gel foi corado com solução de comassie blue (0,1% comassie blue R-250, 50% metanol, 10% ácido acético glacial) por 1-2 horas e descorado em solução descorante (30% etanol, 10% ácido acético glacial) até a visualização das bandas das MMPs, correspondentes ao consumo de gelatina no gel. Os zimogramas foram digitalizados e as bandas correspondentes à atividade proteolítica das MMPs foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion.

2.11- Método de hidroxiprolina

Para avaliar a conteúdo total de colágeno no miocárdio ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com mistura de cetamina e xilazina, a cavidade torácica aberta e o coração foi rapidamente removido. 20-30mg da parede livre do ventrículo esquerdo foram coletados, cortados em pequenos fragmentos e hidrolisados em 3mL de HCl 6N, a 130°C por 4 horas. Após resfriado, 5µL da amostra foram diluídos para volume final de 2mL em água e incubado com 1mL de solução de cloramina T (14,1mg/mL cloramina T, 10% n-propanol, 80% tampão pH6.0 (50g/L ácido cítrico, 1,2% ácido acético 96%, 120g/L acetato de sódio, 34g/L de hidróxido de sódio) a temperatura ambiente por 20 minutos. Após estes período, foi adicionado 1mL de solução de ácido perclórico/aldeído (150mg/mL p-dimetilamino benzaldeído, 60% n-propanol, 26% ácido perclórico 60%), agitado vigorosamente e incubado em banho maria a 60°C por 15 minutos. As amostras foram resfriadas e foi realizada a leitura colorimétrica em espectrofotômetro a 550nm.

Paralelamente, foi feita uma curva padrão de hidroxiprolina (figura 6), variando a concentração no intervalo de 0,1 a 3 µg/mL, que serviu como referência para o cálculo do conteúdo de hidroxiprolina no miocárdio. Os dados são apresentados como µg hidroxiprolina/mg tecido fresco.

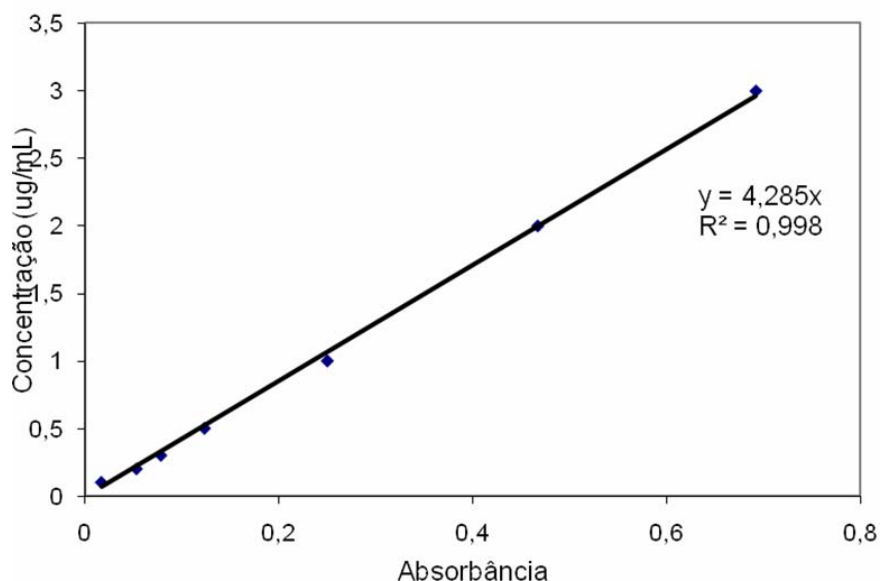


Figura 7- Curva padrão de hidroxiprolina.

2.12- RT-PCR

RT-PCR foi realizado para avaliar a expressão do marcador molecular de hipertrofia cardíaca β -MHC no VE de camundongos tratados com siRNA e submetidos à sobrecarga pressórica crônica por diferentes períodos experimentais.

2.12.1- Extração de RNA de tecido cardíaco

Ao final do período experimental, os camundongos foram anestesiados com tiopental, a cavidade torácica foi aberta e o VE rapidamente removido e congelado em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando Trizol, de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA foi eluído em 20 μ L de água DEPC por 10 minutos a 65°C e quantificado em espectrofotômetro a 260nm. A avaliação da integridade do RNA foi feita como descrito em 10.2.

2.12.2- Reação de RT-PCR multiplex em uma etapa

Foram feitas reações de RT-PCR multiplex, onde é possível utilizar mais de um par de primers específicos na mesma reação e, assim, minimizar erros devidos a reações de RT-PCR feitas em eppendorfs diferentes, erros de pipetagem, diferença na eficácia das enzimas nas reações, entre outros. Desta maneira, foi feita a reação multiplex de β -MHC e GAPDH (controle interno). O gene de GAPDH foi escolhido para a normalização dos resultados (controle interno), uma vez que a literatura mostra que GAPDH é um gene *housekeeping* que tem sido utilizado extensivamente em estudos de expressão gênica em hipertrofia cardíaca (WINER et al., 1999), mantendo seus níveis de expressão constante durante os ensaios de sobrecarga pressórica.

Assim, o protocolo envolveu a síntese de cDNA (transcrição reversa) a partir de RNA total, com o uso da enzima de transcrição reversa SuperScriptII e primers específicos, e a amplificação (PCR) em uma mesma reação.

2.12.2.1- Multiplex β -MHC e GAPDH

Para a reação de RT-PCR foram adicionados:

- 50ng RNA total;
- 25ng primer GAPDH s,
- 25ng primer GAPDH as,
- 50ng primer β -MHC s,
- 50ng primer β -MHC as,
- 1 μ L dNTP 40mM,
- 10 μ L 5x first strand buffer,

- 1 μ L de Super Script II (diluída 1:16),
- 0,5 μ L de Taq DNA polimerase,
- H₂O milli Q autoclavada para 50 μ L.

A reação foi incubada por 15 minutos a 42°C para a transcrição reversa e posteriormente foram realizados 30 ciclos de amplificação, com a temperatura de anelamento de 47°C, de acordo com a curva de padronização mostrada na figura 7. Os fragmentos resultantes foram submetido à eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo, em tampão TAE (40mM tris-acetato, 2mM EDTA, pH 8,5), e visualizados com luz UV. O amplicon de β -MHC possui cerca de 200pb e o de GAPDH cerca de 300pb.

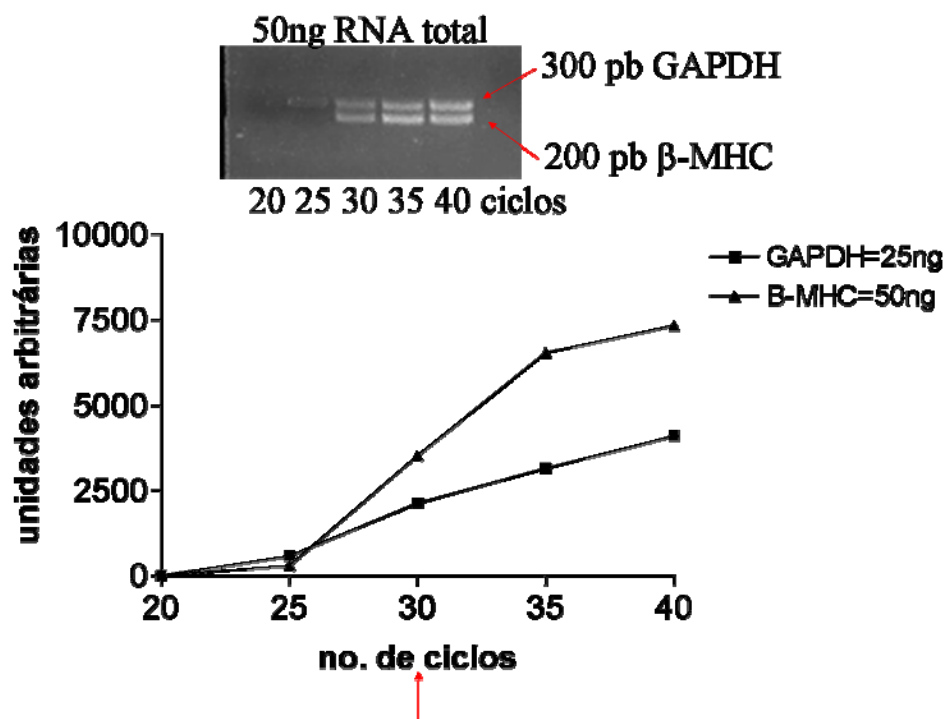


Figura 8- Padronização da reação de RT-PCR para a expressão dos genes de β -MHC e GAPDH em coração de camundongos. Exemplos representativos de produtos de PCR utilizando primers específicos para β -MHC e GAPDH e diferentes ciclos de amplificação.

As bandas dos géis de PCR foram quantificadas por densitometria óptica através do software Scion. Na análise de expressão de β -MHC, foi utilizado o valor lido de β -MHC normalizado pelo valor de GAPDH (padrão interno).

2.13- Análise histológica

Para a análise morfométrica e de fibrose, corações de camundongos foram fixados em formalina 10% por 24 horas e secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com tricrômico de Masson, conforme etapas abaixo:

- Hematoxilina de Groat – 5 a 10 minutos
- Lavar em água corrente e depois em água acidificada 1%
- Rouge Malloty – 10 a 15 minutos
- Lavar em água acidificada 1%
- Passar em ácido fosfomolibdico 10%
- Passar em água acidificada 1%
- Verde luz – 13 a 15 minutos

As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e observadas em microscópio de luz convencional. 8 campos por secção foram digitalizados na magnitude de 400x. Os diâmetros de 60 miócitos cardíacos foram mensurados ao acaso, utilizando-se uma régua calibrada acoplada ao microscópio. As áreas de fibrose, indicadas pela coloração verde, foram quantificadas pelo software Bio Color Scanner 2 Pro. Os dados de fibrose são apresentados como a razão entre a área do interstício e a área total do miocárdio.

2.14- Imunohistoquímica

Para análise da localização da expressão da FAK no miocárdio, corações de camundongos foram fixados em formalina 10% por 24 horas e secções histológicas foram desparafinizadas, hidratadas e tiveram a peroxidase endógena bloqueada por 3 incubações de 3 minutos em solução de H_2O_2 10%. As lâminas foram lavadas com PBS e procedeu-se a recuperação antigênica pela incubação por 30 minutos a 95°C em tampão citrato 10mM pH6.0. As lâminas foram lavadas em PBS, incubadas com solução de bloqueio (5% BSA em 0,1M PBS) por 45 minutos a temperatura ambiente, seguido de incubação com solução de anticorpo anti-FAK em BSA 1%, na diluição 1:50, a 4°C por toda a noite.

As lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 1 hora a 37°C com o sistema Envision peroxidase (Dako). Após este período, as lâminas foram lavadas em PBS e o incubadas por 5 minutos a 37°C em solução de DAB (60mg de DAB em 100mL PBS a 37°C, 1,5mL H_2O_2 10% e 1mL DMSO). As lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Mayer por 10 a 30 segundos. Em seguida, foram lavadas, passadas em água amoniacal e em água corrente. As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e observadas em microscópio de luz convencional.

A especificidade do anticorpo secundário foi testada em experimentos de controle negativo. Na ausência de anticorpo primário, a aplicação de anticorpo secundário falha na produção de coloração significativa.

2.15- Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média±erro padrão. Os valores foram comparados empregando-se ANOVA (*one way*), seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $P < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

3- RESULTADOS

3.1- Padronização do silenciamento gênico da FAK no miocárdio de camundongos por siRNA

Foram realizados experimentos de padronização do modelo de interferência por RNA para o silenciamento gênico da FAK no miocárdio de camundongos. Para isso, experimentos preliminares com camundongos Swiss normais foram realizados para avaliação da eficiência do silenciamento em resposta a diferentes doses de siRNA e vias de administração. Posteriormente, foram avaliados o curso temporal do silenciamento no miocárdio, o silenciamento da FAK em miócitos e fibroblastos cardíacos isolados, efeitos inespecíficos, *off-targets* e o silenciamento da FAK em outros tecidos.

3.1.1- Ensaios dose-resposta

Ensaios do tipo dose-resposta foram realizados para estimar a dose adequada de siRNA_{FAK} capaz de silenciar eficientemente a FAK no miocárdio de camundongos. Para isso, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados com injeções lentas de 5, 15 ou 30µg de siRNA_{FAK} diluídos em 300µL de PBS (VH). Os animais controle foram tratados somente com PBS. Após 1 dia da injeção, os animais foram sacrificados e a expressão da FAK no miocárdio foi avaliada por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK. A Figura 9 mostra os resultados de dose-resposta de siRNA_{FAK} no silenciamento gênico da FAK. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. Observa-se que, em relação aos animais controles, 24 horas após a administração de 5µg de siRNA_{FAK} houve um silenciamento da FAK de 47%, enquanto que a injeção de 15µg de siRNA_{FAK} levou a um silenciamento de 72%. Contudo, a injeção 30µg de siRNA_{FAK} resultou em um silenciamento de apenas de 42%. Especulamos que o menor efeito observado em concentração mais elevada de solução de siRNA_{FAK} seja devido à agregação das moléculas de siRNA, dificultando a absorção celular. Com base nestes resultados, os experimentos com camundongos coarctados foram conduzidos com a dose de 15µg de siRNA_{FAK} em 300µL de PBS.

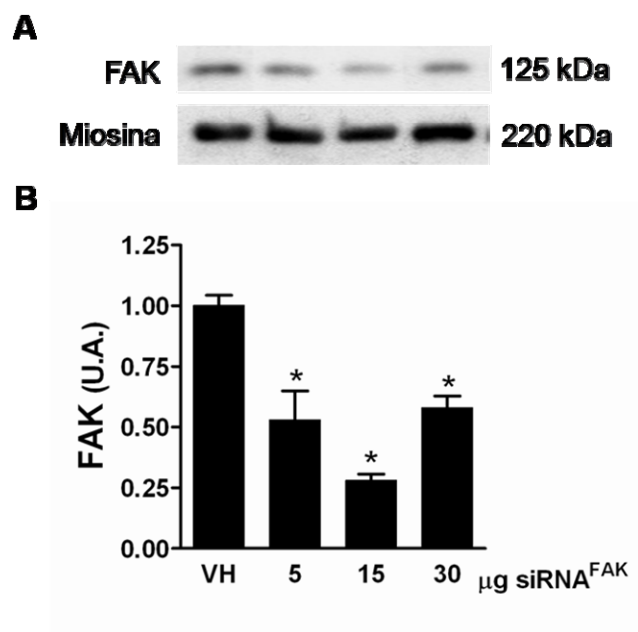


Figura 9- Ensaio dose-resposta para siRNA_{FAK}.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK e anti-miosina.

B- Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundondos. VH: controle PBS. N=4. *P<0/05 em relação ao VH.

3.1.2- Padronização da velocidade de injeção

Foram avaliados dois tipos de injeção: uma rápida e outra lenta (em pequenos bolus). Na injeção rápida, 15µg de siRNA_{FAK} diluídos em 50µL de PBS foram injetados de uma só vez na veia jugular direita de camundongos. Na injeção lenta, 15µg de siRNA_{FAK} diluídos em 300µL de PBS foram injetados lentamente na veia jugular direita de camundongos, sendo injetados 40µL a cada intervalo de 5 segundos. Os animais controle foram tratados com PBS (VH).

Os camundongos foram sacrificados 24 horas após a injeção de siRNA_{FAK} e a expressão de FAK foi avaliada por western blotting (Figura 10). As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. Como demonstrado na Figura 10, a injeção lenta de 15µg de siRNA_{FAK} resultou em uma redução de 72% na expressão da FAK no miocárdio, em relação ao controle, enquanto que a injeção rápida levou a um silenciamento de 29%. Como consequência deste resultado, optamos pela utilização da injeção lenta nos experimentos de iRNA.

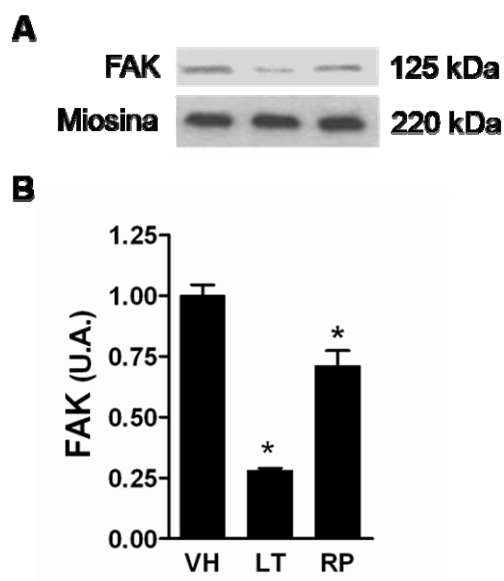


Figura 10- Padronização da velocidade de injeção de siRNA em camundongos.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK e anti-miosina. VH: controle PBS, LT: injeção lenta de siRNA, RP: injeção rápida de siRNA.

B- Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos. N=6. *P<0/05 em relação ao VH.

3.1.3- Vias de administração de siRNA

A injeção hidrodinâmica pela veia caudal de camundongos é um método amplamente utilizado na literatura para a administração de siRNAs. Ensaios deste tipo foram realizados para comparar a eficiência de silenciamento gênico da FAK no miocárdio com os obtidos anteriormente pela injeção na veia jugular. Camundongos foram tratados com 15µg de siRNA_{FAK} diluídos em 3mL de PBS administrados pela veia caudal. Animais controle foram tratados com 15µg de siRNA_{GFP} diluídos em 3mL de PBS. Um dia após a injeção, os animais foram sacrificados e a expressão de FAK foi avaliada no miocárdio por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK. De acordo com a Figura 11, podemos concluir que esta via de administração (veia caudal) é ineficaz para o silenciamento da FAK no miocárdio e, desta maneira, optamos pela utilização da veia jugular.

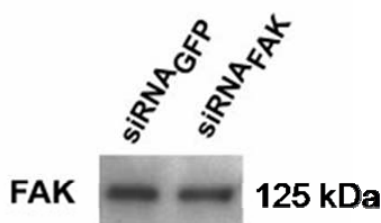


Figura 11- Injeção hidrodinâmica de siRNA_{FAK} via veia caudal em camundongos. Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpo anti-FAK. N=4.

3.1.4- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK

Para avaliar o curso temporal do silenciamento da FAK no miocárdio, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados com 15µg de siRNA_{FAK} em 300µL de PBS ou 15µg de siRNA_{GFP} em 300µL PBS. Animais controle foram tratados somente com PBS (VH). Após 1, 7, 15, 21 e 28 dias da infusão de siRNA_{FAK}, os animais foram sacrificados e a expressão protéica da FAK no miocárdio foi avaliada por western blotting assim como o RNAm por northern blotting.

A Figura 12 A-B apresenta os resultados de western blotting. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. Podemos observar que, em relação aos animais controle (VH), houve um silenciamento do gene da FAK em torno de 72% no primeiro dia após a injeção de 15µg de siRNA_{FAK}, ocorrendo redução gradativa do silenciamento até o retorno aos níveis normais após 28 dias da injeção (7 dias- 41%, 15 dias- 41%, 21 dias- 10%). Como esperado, não foi observada alteração da expressão gênica de FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA_{GFP}.

A Figura 12C-E apresentam os resultados obtidos por northern blotting. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de RNA ribossômico 18S. Podemos observar que, em relação aos animais controle (VH), houve uma redução na quantidade de RNAm da FAK em torno de 70% no primeiro dia após a injeção de 15µg de siRNA_{FAK}, ocorrendo redução gradativa do silenciamento até o retorno aos níveis normais após 21 dias da injeção (7 dias- 37%, 15 dias- 40%). Novamente, não observamos alterações na quantidade de RNAm de FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA_{GFP}.

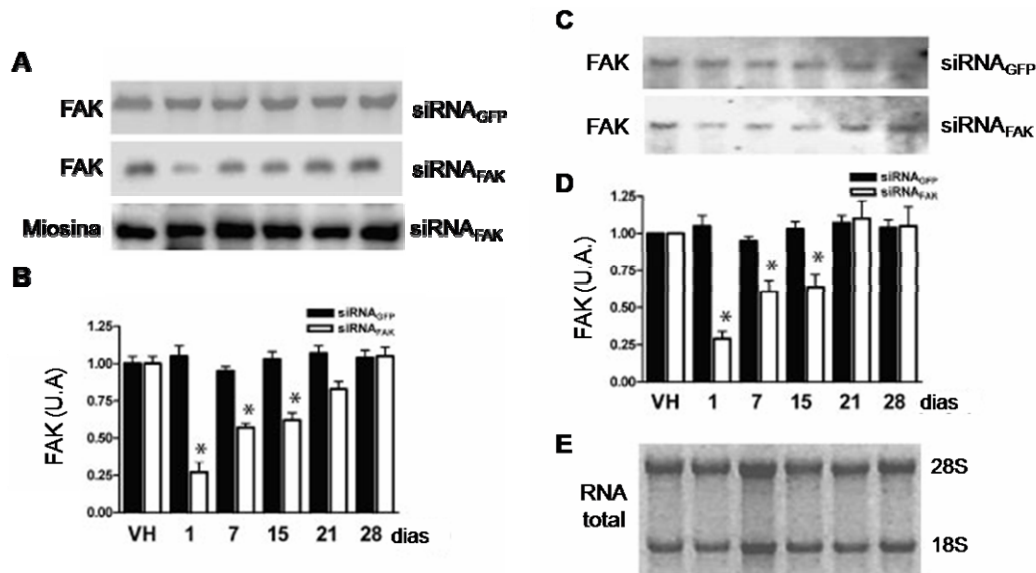


Figura 12- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK no miocárdio de camundongos.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpo anti-FAK e anti-miosina.

B- Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos. N=6. *P<0/05 em relação ao VH.

C- Exemplos representativos de northern blotting realizados com RNA total de corações de camundongos e sonda para RNAm de FAK.

D- Valores médios da quantidade de RNAm de FAK normalizada pela quantidade de RNA ribossômico 18S em miocárdio de camundongos. VH: controle PBS, N=3. *P<0/05 em relação ao VH.

E- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.

3.1.5- Análise do silenciamento do gene da FAK em cardiomiócitos e fibroblastos isolados de camundongos adultos

Uma vez que a administração sistêmica de siRNA pode silenciar o gene da FAK nos diversos tipos celulares do miocárdio, foi examinado se o *knockdown* da FAK ocorria de modo efetivo nos cardiomiócitos e fibroblastos cardíacos de camundongos tratados com siRNA_{FAK}. Assim, camundongos foram tratados com 15µg de siRNA_{FAK} em 300µL de PBS e , após 24 horas, estes tipos celulares foram isolados do coração, como descrito em métodos. A expressão da FAK foi avaliada por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK. Animais controle foram tratados somente com PBS. Como mostra a Figura 13, houve um decréscimo significativo da expressão de FAK nos cardiomiócitos (~80%) e fibroblastos cardíacos (~63%) após o tratamento com siRNA_{FAK}, comparável aos dados de miocárdio total.

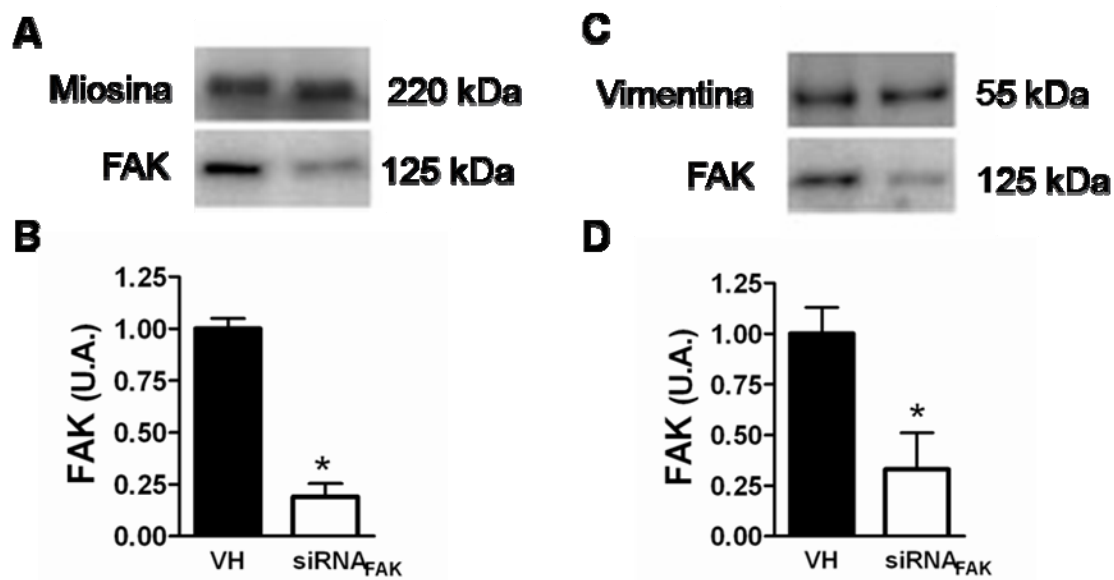


Figura 13- Silenciamento do gene da FAK em células cardíacas isoladas de camundongos adultos.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de cardiomiócitos isolados de camundongos tratados com PBS (VH) ou siRNA_{FAK}, e anticorpo anti-FAK e anti-miosina.

B- Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em cardiomiócitos isolados de corações de camundongos adultos. VH: controle PBS. N=4. *P<0/05 em relação ao VH.

C- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de fibroblastos isolados de camundongos tratados com PBS ou siRNA_{FAK}, e anticorpo anti-FAK e anti-vimentina.

D- Valores médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de vimentina em fibroblastos isolados de corações de camundongos adultos. VH: controle PBS. N=4. *P<0/05 em relação ao VH.

3.1.6- Controles do modelo de iRNA no miocárdio em camundongos

3.1.6.1- Análise da especificidade do siRNA_{FAK} - *off-targets*

A especificidade do siRNA da FAK foi avaliada através de duas abordagens diferentes:

1) Avaliação da expressão de uma proteína não regulada direta ou indiretamente pela proteína de interesse: esta informação é relacionada com a especificidade da sequência de oligonucleotídeos do siRNA_{FAK} ao RNAm da FAK. O silenciamento gênico de outras proteínas além da FAK por siRNA_{FAK} é denominado de *off-target* e não é desejado.

2) Avaliação dos efeitos de siRNA irrelevante (siRNA_{GFP}): neste caso é utilizado um siRNA com sequência complementar a nenhuma proteína encontrada nas células de mamíferos, GFP. A informação obtida por estes ensaios permite mostrar que o silenciamento gênico da FAK por siRNA_{FAK} ocorre de maneira sequência-específica e não apenas pela absorção celular de um siRNA.

No primeiro caso, avaliamos a expressão de PYK2, miosina e ERK $\frac{1}{2}$, apresentado na Figura 14. Como os níveis de expressão destas proteínas foram mantidos inalterados após a injeção de siRNA_{FAK} durante todo o curso temporal estudado, podemos sugerir que o siRNA_{FAK} é específico no silenciamento do gene da FAK não ocorrendo o fenômeno conhecido como *off-target*. Como já demonstrado, utilizamos a expressão de miosina como controle interno para normalização das variações da expressão da FAK nos ensaios.

No segundo caso, repetimos os experimentos de curso temporal comparando os efeitos de siRNA_{FAK} e siRNA_{GFP} sobre a expressão da FAK no miocárdio de camundongos. Os resultados mostrados anteriormente na Figura 12 indicam que o tratamento com siRNA_{GFP} não causa mudanças na expressão do gene da FAK e, assim, podemos dizer que o siRNA_{FAK} atua de modo sequência-específico no silenciamento gênico.

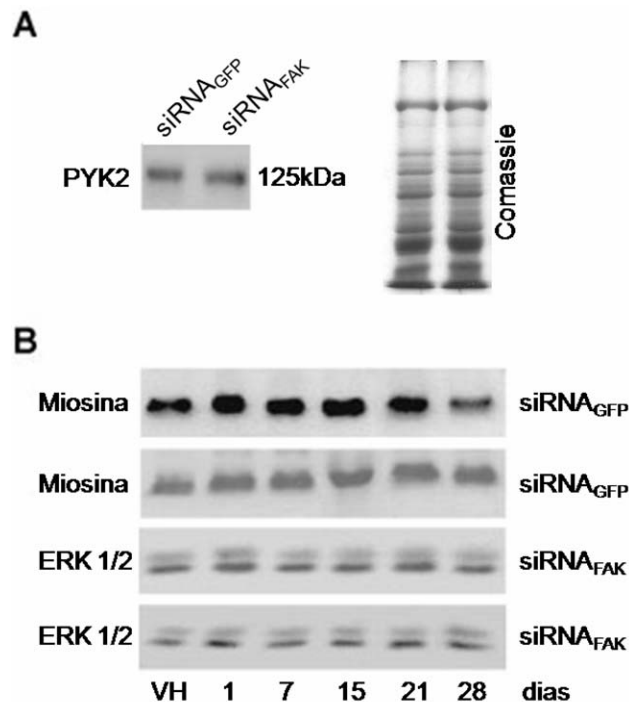


Figura 14- Avaliação de *off-targets* de $siRNA_{FAK}$ no coração de camundongos.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos 1 dia após o tratamento com $siRNA_{FAK}$ ou $siRNA_{GFP}$ e anticorpo anti-PYK2. Gel corado com Coomassie blue representativo do loading de proteínas. N=4.

B- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos 1 a 28 dias após a injeção de $siRNA_{FAK}$ ou $siRNA_{GFP}$ e anticorpos anti-miosina e anti-ERK 1/2. N=6.

3.1.6.2- Indução de resposta não específica - Interferon

Um problema em potencial com a utilização da estratégia de iRNA em mamíferos é a indução de resposta imunogênica, via interferon, uma vez que esta resposta é ativada por RNAs de fita dupla que aparecem como intermediários na replicação de vírus (LEUNG & WHITTAKER, 2005). Quando esta resposta é ativada, há a inibição global e inespecífica da tradução de proteínas, influenciando os efeitos obtidos pela administração de $siRNA_{FAK}$ no miocárdio

Desta maneira, a concentração de interferon gama circulante no plasma de camundongos que receberam 15 μ g de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} por Elisa. Animais controle foram tratados somente com PBS (VH). Como mostrado na Figura 15, injeções de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} não induziram mudanças significativas no nível de interferon gama circulante de camundongos durante os vários períodos experimentais estudados.

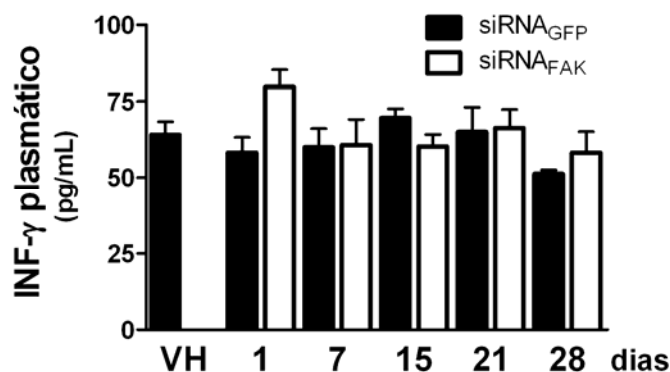


Figura 15- Dosagem de interferon gama circulante no plasma de camundongos submetidos à injeção de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} nos vários dias experimentais. VH: controle PBS. N=9.

3.1.6.3- Efeito sobre o crescimento de camundongos

Visando a aplicação terapêutica de um siRNA, sua toxicidade pode ser avaliada em um primeiro momento por efeitos que se refletem no crescimento e massa corpórea dos animais. Assim, os camundongos que receberam 15 μ g de siRNA_{FAK} tiveram seu peso corporal acompanhado por 28 dias. A Figura 16 mostra que o peso corporal dos animais tratados com siRNA_{FAK} não foi diferente daqueles tratados com PBS ao longo do período experimental.

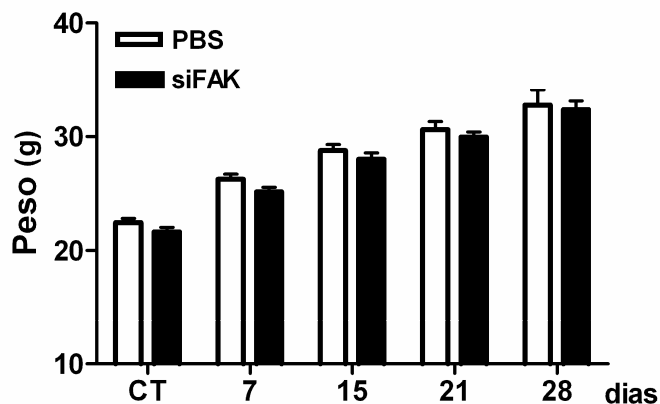


Figura 16- Curva de crescimento de camundongos tratados com PBS ou siRNA_{FAK} por diferentes períodos experimentais. N=15.

3.1.7- Análise do efeito do siRNA_{FAK} na expressão da FAK em outros órgãos

Para avaliar o efeito do siRNA_{FAK} na expressão da FAK nos pulmões, rim e fígado, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados com 15µg de siRNA_{FAK} em 300µL de PBS. Animais controle foram tratados somente com PBS (VH). Após 1, 7, 15, 21 e 28 dias da infusão de siRNA_{FAK}, os animais foram sacrificados e a expressão protéica da FAK foi avaliada por western blotting.

Como apresentado na Figura 17 A-B, em relação aos animais controle, houve um silenciamento do gene da FAK em torno de 70% nos pulmões no primeiro dia após a injeção de 15 µg de siRNA_{FAK}, ocorrendo redução gradativa do silenciamento até o retorno aos níveis normais após 28 dias da injeção (7 dias- 43%, 15 dias- 30%). Nos rins (Figuras 17 C e D), em relação aos animais controle, houve um silenciamento do gene da FAK em torno de 30% no primeiro e sétimo dia após a injeção de 15 µg de siRNA_{FAK}, ocorrendo o retorno dos níveis de expressão normais da FAK a partir do dia 15. Nenhuma redução significativa na expressão do gene da FAK foi observada no fígado dos camundongos após a injeção de 15 µg de siRNA_{FAK} (Figuras 17 E e F).

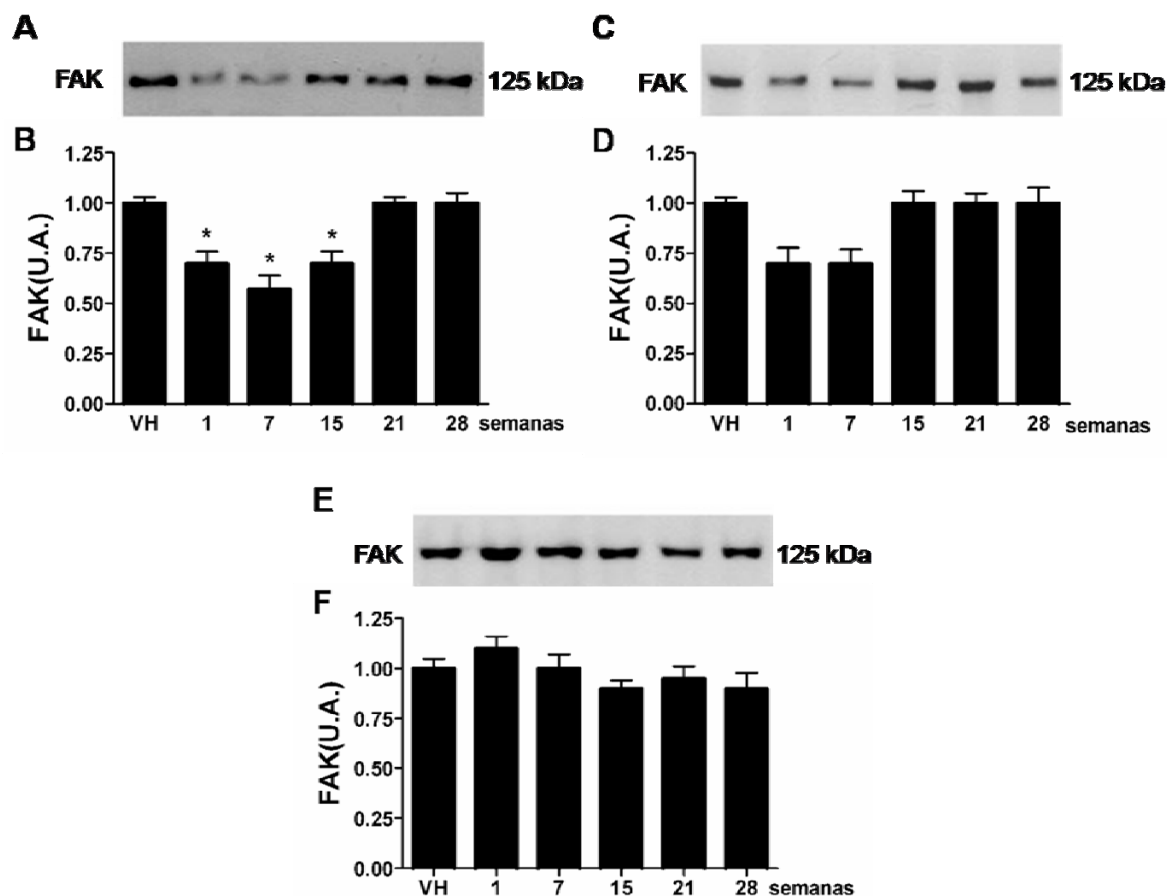


Figura 17- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK em diferentes órgãos utilizando siRNA^{FAK}.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de pulmão de camundongos e anticorpo anti-FAK. CT: controle PBS.

B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK em pulmão de camundongos. N=5. *P<0/05.

C- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de rim de camundongos e anticorpo anti-FAK. CT: controle PBS.

D- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK em rim de camundongos. N=5. *P<0/05.

E- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de fígado de camundongos e anticorpo anti-FAK. CT: controle PBS.

F- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK em fígado de camundongos. N=5. *P<0/05.

3.2- Caracterização do modelo de hipertrofia do ventrículo esquerdo em camundongos

O modelo de coarctação da croça da aorta em camundongos vem sendo utilizado rotineiramente em nosso laboratório. A hipertrofia do VE resulta do aumento de resistência ao fluxo sanguíneo na aorta e, posteriormente, progride para a insuficiência cardíaca. Neste estudo, a intensidade da sobrecarga pressórica foi avaliada através da análise do gradiente de pressão sistólico trans-constricção em camundongos anestesiados. As alterações estruturais do ventrículo esquerdo foram avaliadas através de análise ecocardiográfica e gravimétrica do ventrículo esquerdo, além de análise histológica de amostras coradas com tricrômico de Masson. As alterações funcionais do VE foram avaliadas por ecocardiografia. A expressão e atividade da FAK no miocárdio foram avaliadas por western blotting e imunohistoquímica com anticorpo específico anti-FAK e anti-pFAK, respectivamente. A Tabela I reúne os dados obtidos pela avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos à constricção da aorta por diversos períodos experimentais.

A avaliação do gradiente sistólico de trans-constricção indicou que, entre 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta, os camundongos possuíam gradiente sistólico variando entre 40 e 50 mmHg, sem variações significativas entre os grupos (Tabela I, Figura 18).

Tabela 1- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos submetidos ao modelo de coarctação da aorta.

	<i>CT</i>		<i>Coarctado</i>			
		1 sem	2 sem	3 sem	6 sem	12 sem
Número	8	9	8	7	8	8
Hemodinâmica						
PAS _{CT} (mmHg)	116 ± 3	165 ± 2*	166 ± 2*	179 ± 5*	179 ± 6*	175 ± 4*
PAS _{FE} (mmHg)		119 ± 5	122 ± 3	130 ± 4	132 ± 5	130 ± 4
GrS (mmHg)		46 ± 3	44 ± 2	49 ± 3	47 ± 4	46 ± 4
FC (bpm)	620 ± 28	644 ± 37	637 ± 35	618 ± 31	654 ± 45	686 ± 46
Ecocardiografia						
DDVE (mm)	3.5 ± 0.05	3.9 ± 0.1*	3.5 ± 0.08	3.5 ± 0.09	3.6 ± 0.1	4.0 ± 0.1*
DSVE (mm)	2.0 ± 0.04	2.4 ± 0.08*	2.1 ± 0.05	2.0 ± 0.04	2.1 ± 0.05	2.4 ± 0.07*
EPVE (mm)	0.8 ± 0.02	1.0 ± 0.05*	1.3 ± 0.04*	1.2 ± 0.02*	1.1 ± 0.04*	1.2 ± 0.05*
FS (%)	43 ± 1.1	35 ± 1.9*	44 ± 2.0	40 ± 2.1	38 ± 1.8	37 ± 1.7*
EPR	0.23 ± 0.01	0.26 ± 0.02*	0.37 ± 0.02*	0.34 ± 0.02*	0.31 ± 0.01*	0.30 ± 0.04*
Morfometria						
Peso corporal (g)	30 ± 1	27 ± 0.8	30 ± 0.6	32 ± 0.6	35 ± 0.8	37 ± 0.9*
IMVE (mg/g)	2.8 ± 0.2	3.4 ± 0.2*	3.5 ± 0.3*	3.9 ± 0.3*	4.0 ± 0.3*	4.6 ± 0.5*
DCM (µm)	13 ± 0.7	15 ± 0.5	16 ± 0.2*	18 ± 0.3*	19 ± 0.4*	18 ± 0.4*
AI (%)	3.6 ± 0.1	5.7 ± 0.3	7.2 ± 1.2*	7.0 ± 1.8*	9.0 ± 1.7*	13 ± 2.1*

CT, controle (operação fictícia); Coarctado, com constricção da aorta; PAS_{CT}, pressão arterial sistólica aferido na carótida; PAS_{FE}, pressão arterial sistólica aferida na femoral; GrS, gradiente sistólico; FC, frequência cardíaca; DDVE, diâmetro diastólico do VE; DSVE, diâmetro sistólico do VE; EPVE, espessura da parede do VE; FS, fração de encurtamento do VE; EPR, espessura relativa do VE; IMVE, índice de massa do VE; DCM, diâmetro do cardiomiócito; AI, área do interstício. * P<0.05 comparado aos valores dos animais CT.

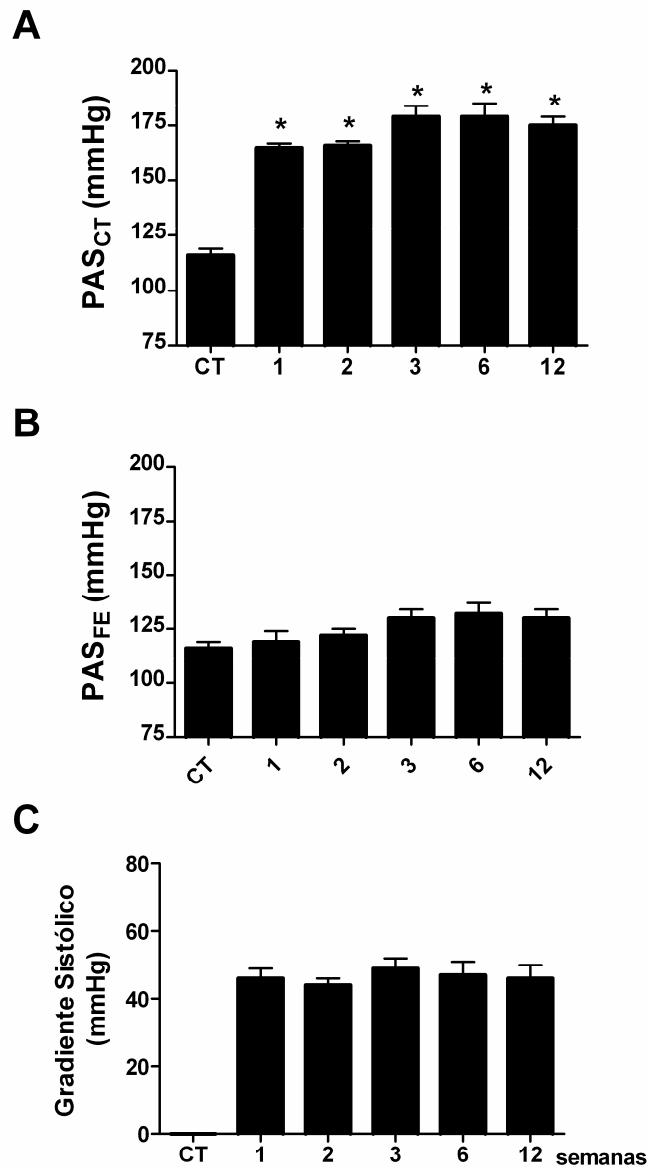


Figura 18- Análise hemodinâmica de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.

A- Gráfico de barras indica os valores médios de pressão arterial sistólica aferido na carótida (PAS_{CT}). *P<0/05 em relação ao CT.

B- Gráfico de barras indica os valores médios de pressão arterial sistólica aferida na femoral(PAS_{FE}). *P<0/05 em relação ao CT.

C- Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação. *P<0/05 em relação ao CT.

A avaliação ecocardiográfica mostrou, de acordo com a Tabela I e Figura 19, que a constrição da aorta induz o aumento na espessura do VE (EPVE) na primeira semana de sobrecarga pressórica, indicando o rápido crescimento hipertrófico típico deste modelo. Uma dilatação transiente do VE (DDVE) com redução da fração de encurtamento (%FS) foi observada neste grupo de animais, provavelmente devido ao impacto da constrição súbita. Foi observado um aumento da EPVE sem dilatação ou redução na %FS em camundongos avaliados 2, 3 ou 6 semanas após a coarctação da aorta, indicando o estágio de hipertrofia compensada. Contudo, camundongos após 12 semanas de constrição da aorta exibiam dilatação da câmara e redução na fração de encurtamento, em adição à hipertrofia, indicando o início da descompensação da hipertrofia cardíaca.

As medidas de índice de massa do VE (IMVE, normalizadas pelo peso) confirmaram o aumento progressivo na massa do VE dos corações dos camundongos submetidos à constrição da aorta (Tabela I). A espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo (EPR) aumentou significativamente nos animais coarctados, em relação ao controle sham, indicando hipertrofia do tipo concêntrica, característica do modelo de sobrecarga pressórica. (Tabela I).

A análise morfométrica de secções histológicas de corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta (Fig. 20A) mostrou hipertrofia dos cardiomiócitos, em relação aos animais controle com cirurgia fictícia, indicada pelo aumento do diâmetro médio. A análise quantitativa das áreas de fibrose indicou aumento progressivo das mesmas ao longo do período de 12 semanas de seguimento (figura 20B). As Figuras 20C-E mostram exemplos representativos do aumento da área ocupada pelo interstício no miocárdio de camundongos submetidos à coarctação da aorta.

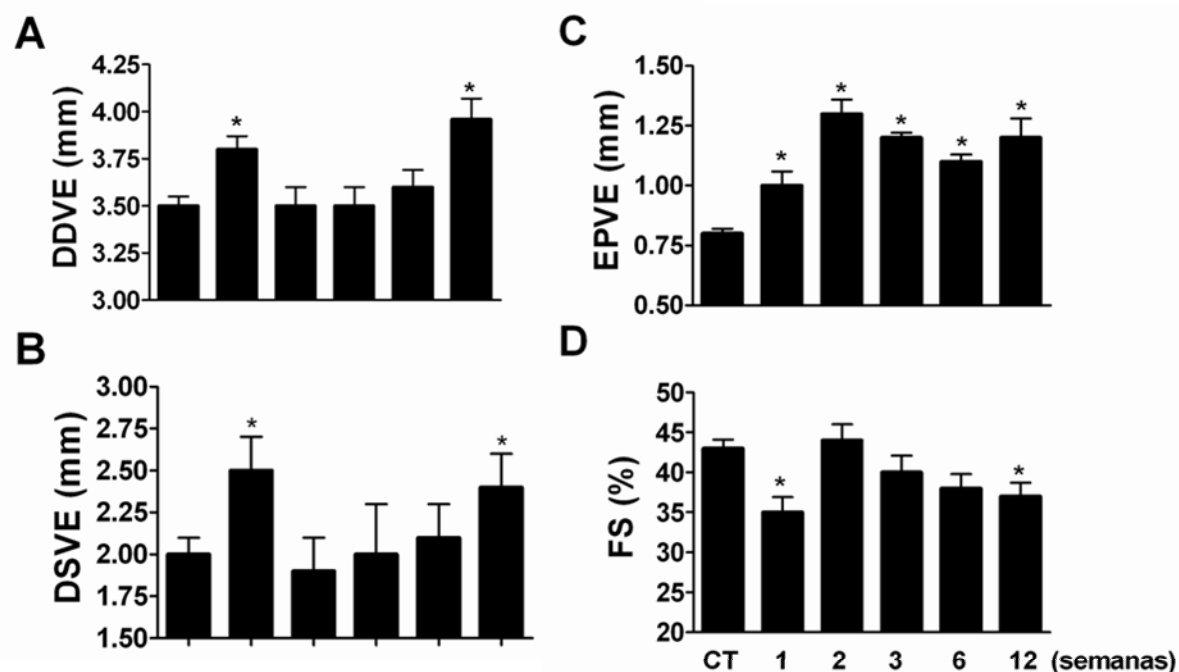


Figura 19- Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.

A- Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE (diâmetro diastólico final) do VE de camundongos com cirurgia fictícia (CT) ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

B- Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE (diâmetro sistólico final) do VE. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

C- Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE (espessura da parede) do VE. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

D- Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS (% , fração de encurtamento) do VE. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

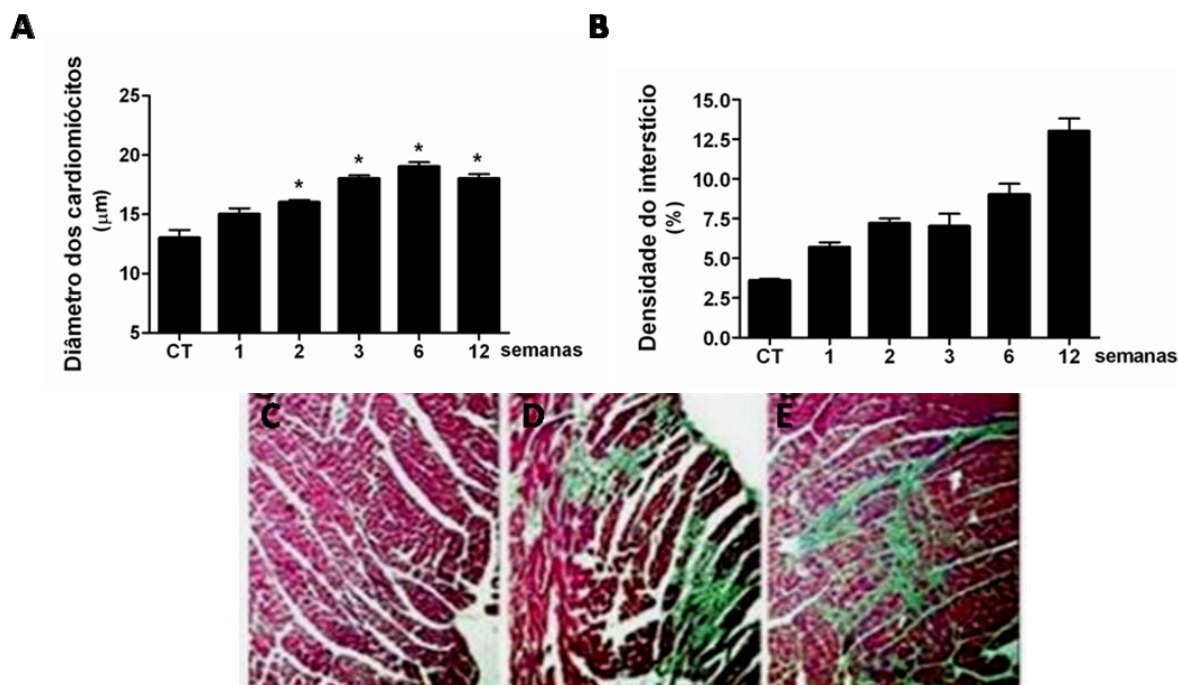


Figura 20- Análise morfométrica e histológica do VE de camundongos Swiss submetidos ao modelo de coarctação da aorta.

A- Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia (CT) ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação da aorta. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

B- Gráfico de barras indica os valores médios percentuais da densidade de interstício do VE. CT: cirurgia fictícia (sham), 1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a coarctação da aorta. * $P < 0,05$ em relação ao CT.

C- Coloração Tricrômico de Masson. Miocárdio controle. 400x.

D- Coloração Tricrômico de Masson. Miocárdio proveniente de camundongo com 1 semana de coarctação da aorta. 400x.

E- Coloração Tricrômico de Masson. Miocárdio proveniente de camundongo com 12 semanas de coarctação da aorta. 400x.

A análise da expressão da FAK no miocárdio por western blotting (Fig. 21A) indicou o aumento de 100% da expressão da FAK nos corações de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica em 1 a 12 semanas de constrição da aorta, em relação aos controles sham. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. A atividade da FAK (pFAK) foi avaliada através de western blot com anticorpo anti-pFAK-Tyr-397, uma vez que é bem estabelecido que a autofosforilação do resíduo tirosina 397 da FAK corresponde a sua ativação. O exemplo representativo mostrado na Figura 21A indica que a quantidade de FAK fosforilada detectada pelo anticorpo fosfoespecífico também aumentou significativamente, com picos de elevação na primeira e na 12^a. semanas (100% e 80%, respectivamente) após a constrição da aorta.

O gráfico da Figura 21A indica a razão entre as medidas densitométricas obtidas dos blots marcados com anticorpos anti-pFAK-Tyr397 e anti-FAK. Esta razão pode ser utilizada para estimar diferenças na atividade enzimática da FAK no miocárdio de camundongos controle e daqueles submetidos à coarctação da aorta. Os resultados mostrados no referido gráfico indicam que a razão pFAK/FAK aumenta cerca de 100% após 1 semana de coarctação da aorta e 80% após a 12^a. Notavelmente, estes picos na razão pFAK/FAK coincidem com a dilatação e disfunção do VE observadas por ecocardiografia (Figura 20). A coloração por Comassie Blue das proteínas resolvidas em SDS-PAGE confirma o uso de quantidades iguais de proteína total nos géis (Figura 21A).

A distribuição da FAK no miocárdio, analisada por imunohistoquímica (Figuras 21B a E), indicou marcação tanto de cardiomiócitos como de tecido intersticial. Nas amostras de miocárdio de animais controle (sham), a marcação com anticorpo anti-FAK foi distribuída de maneira uniforme, sendo praticamente restrita aos cardiomiócitos (Figuras 20B e C). Contudo, em amostras de miocárdio provenientes de animais coarctados de 1 a 12 semanas, o anticorpo anti-FAK marcou miócitos cardíacos e áreas de fibrose intersticial focal e perivascular (Figuras 20 D e E). Como os fibroblastos são associados às regiões de fibrose miocárdica, presumimos que são estas as células marcadas com o anticorpo anti-FAK nas áreas intersticiais. Assim, estes resultados sugerem que o aumento na expressão da FAK no miocárdio de camundongos coarctados (Figura 21A) é proveniente do aumento de celularidade nas regiões de fibrose, assim como o aumento da razão de pFAK/FAK, uma vez que essas células encontram-se ativas.

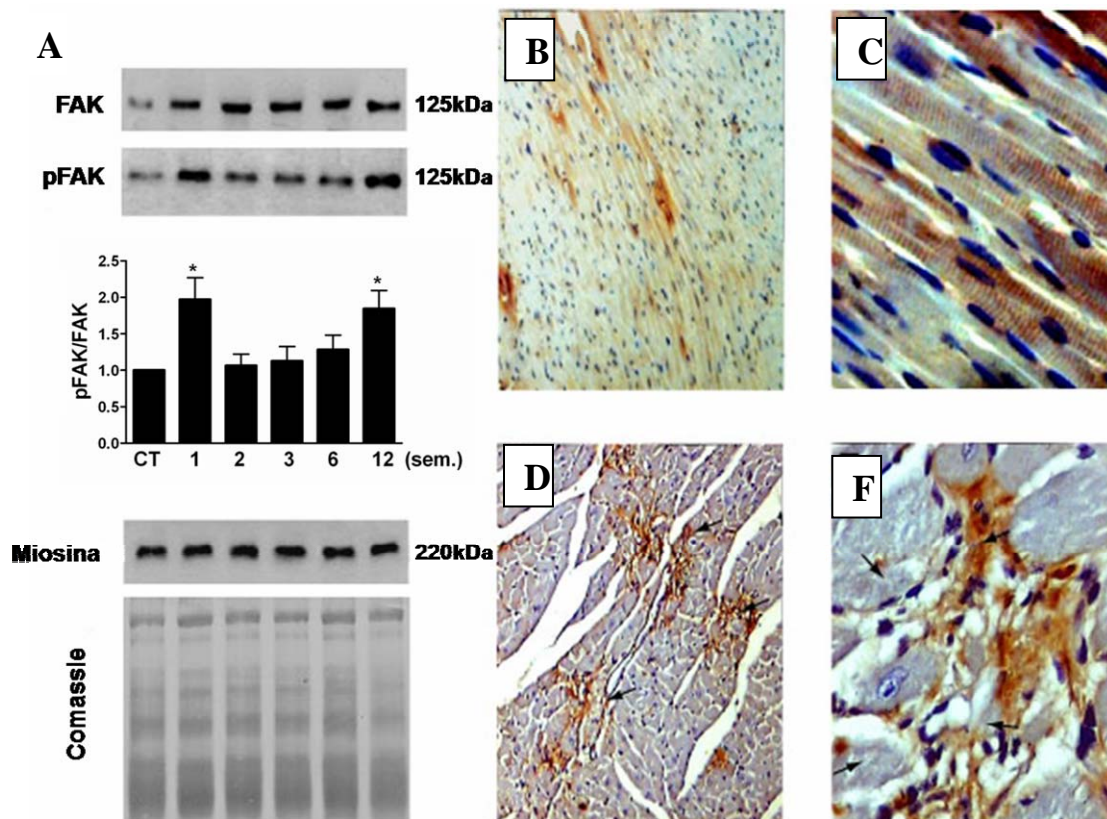


Figura 21- Modelo de coarctação da aorta em camundongos Swiss - FAK.

- A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK, anti-pFAK e anti-mosina. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 sem.: semanas de coarctação. Gráfico indica os valores médios da razão da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em miocárdio de camundongos. *P<0/05 em relação ao CT. Gel corado com Comassie blue representativo do loading de proteínas.
- B- Imunohistoquímica com anticorpo anti-FAK.Miocárdio controle. SO: cirurgia fictícia (sham). 400x
- C- Imunohistoquímica com anticorpo anti-FAK.Miocárdio controle. SO: cirurgia fictícia (sham). 1200x
- D- Imunohistoquímica com anticorpo anti-FAK. Miocárdio proveniente de camundongo com 12 semanas de coarctação da aorta. 400x
- E- Imunohistoquímica com anticorpo anti-FAK. Miocárdio proveniente de camundongo com 12 semanas de coarctação da aorta. 1200x

3.3 - Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com siRNA_{FAK}.

Para avaliar a influência da FAK nas mudanças fenotípicas induzidas pela coarctação da aorta no ventrículo esquerdo, camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados preventivamente com uma única injeção de 15µg de siRNA_{FAK} em 300µL de PBS ou 15µg de siRNA_{GFP} em 300µL de PBS. Um dia após a infusão, os camundongos foram submetidos à constricção da aorta e foram acompanhados por 1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a constricção. Animais controle (CT) sofreram cirurgia fictícia (sham). As dimensões e função do ventrículo esquerdo foram avaliadas por ecocardiografia e as alterações estruturais através de gravimetria e análise histológica pela coloração Tricrômico de Masson. A expressão e atividade da FAK no miocárdio foram avaliadas por western blotting, a expressão gênica por northern blotting e a expressão do marcador de hipertrofia cardíaca β -MHC por RT-PCR. Também foi avaliado o conteúdo de colágeno no miocárdio pelo método de hidroxiprolina, a atividade de MMP-2 por zimografia e sua expressão em fibroblastos isolados por western blotting.

3.3.1- Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio

Para avaliar o curso temporal do silenciamento da FAK no miocárdio, ao final do período experimental os animais foram sacrificados e a expressão gênica da FAK foi avaliada por northern blotting assim como a expressão protéica por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK.

Na Figura 22 (A-B) são apresentados os resultados de western blotting. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. A coarctação da aorta induziu o aumento da expressão da FAK no miocárdio de animais tratados com siRNA_{GFP} de 44%, 40%, 126% e 115% nas semanas 1, 3, 6 e 12, respectivamente, em relação aos animais controle (CT). Uma única injeção de siRNA_{FAK} foi capaz de reduzir significativamente a expressão da FAK no miocárdio de camundongos coarctados em cerca de 67% no primeiro dia e 45% na primeira e segunda semana após a

coarctação. Os níveis de expressão da FAK foram similares aos animais tratados com siRNA_{GFP} a partir da terceira semana. Quando comparamos os animais coarctados tratados com siRNA_{GFP} e siRNA_{FAK}, observamos uma diminuição da expressão de FAK no miocárdio dos animais tratados com siRNA_{FAK} em cerca de 65%, 60% e 52% no primeiro dia e nas semanas 1 e 2 após a constrição da aorta, respectivamente.

A Figura 22 (C-E) apresenta os resultados obtidos por northern blotting. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de RNA ribossômico 18S. Após 7 dias de coarctação da aorta notamos o aumento de 140% na expressão de RNAm da FAK no miocárdio de animais tratados com siRNA_{GFP}, em relação aos animais controle. Por outro lado, os animais equivalentes tratados com siRNA_{FAK}, apresentavam diminuição de 40% na expressão gênica da FAK, em relação aos animais controle.

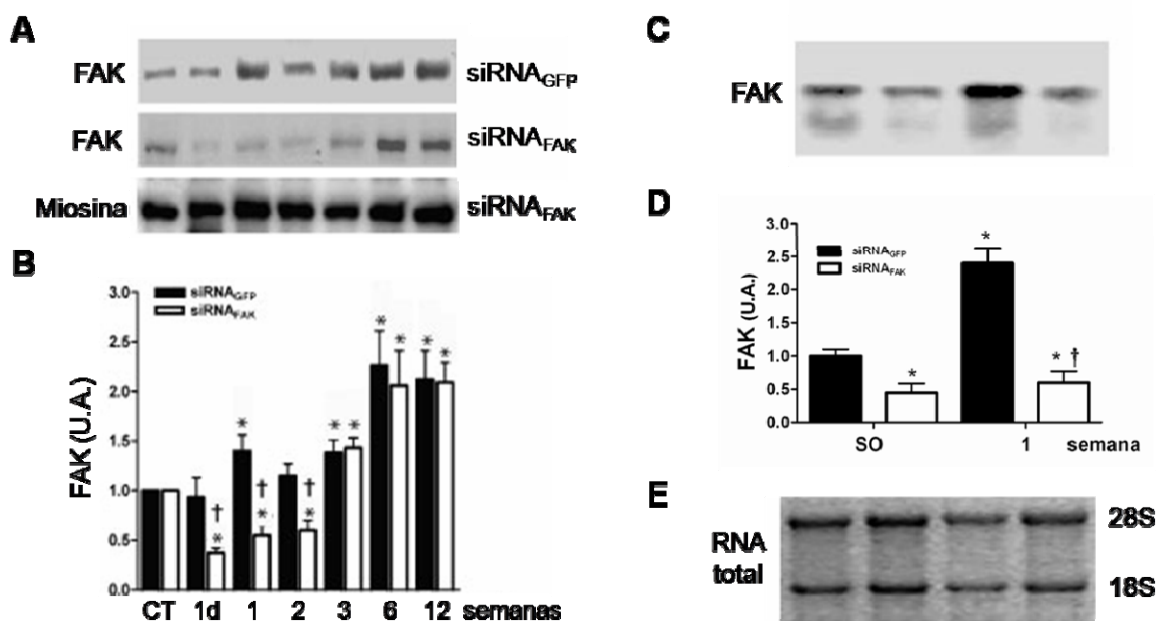


Figura 22- Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA_{FAK} anterior à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.

- A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK e anti-miosina. CT: cirurgia fictícia (sham).
- B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos. N=6. *P<0,05 em relação aos animais CT, †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- C- Exemplos representativos de northern blotting realizados com RNA total de corações de camundongos e sonda para RNAm de FAK.
- D- Valores médios da quantidade de RNAm de FAK normalizada pela quantidade de RNA ribossômico 18S em miocárdio de camundongos. SO: cirurgia fictícia (sham), 1 semana: semana após coarctação. N=3. *P<0,05 em relação aos animais CT, †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- E- Gel desnaturante representativo da integridade de RNA total.

A atividade da FAK no miocárdio foi avaliada utilizando anticorpo fosfo-específico (pFAK-Tyr 397). Figura 23 mostra que, em corações de camundongos submetidos à 7 dias de coarctação, a redução na expressão gênica da FAK induzida por siRNA_{FAK} era acompanhada por uma redução proporcional (~50%) na quantidade de FAK fosforilada, ou seja, de atividade, quando comparado ao animal tratado com siRNA_{GFP} correspondente.

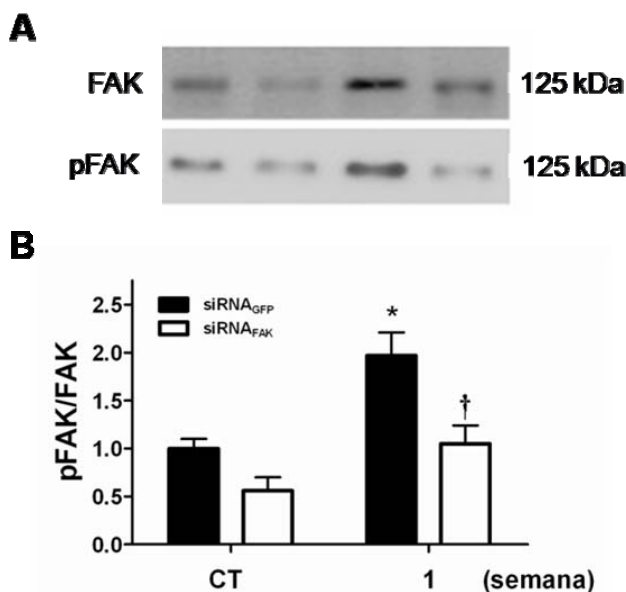


Figura 23- Avaliação da atividade da FAK no miocárdio de camundongos tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à 7 dias de coarctação da aorta.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK e anti-pFAK.

B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com pFAK normalizada pela quantidade de FAK em miocárdio de camundongos. CT: cirurgia fictícia. 1 semana: semana de coarctação. N=4. *P<0,05 em relação aos animais CT, †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.2- Análise hemodinâmica e ecocardiográfica do VE

1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a injeção preventiva de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e coarctação da aorta ou cirurgia fictícia, os camundongos foram submetidos à avaliação hemodinâmica e análise estrutural e funcional do VE por ecocardiografia. Estes resultados são apresentados na Tabela II.

Tabela 2- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações de camundongos tratados previamente com siRNA e submetidos à sobrecarga pressórica crônica.

	<i>siRNA_{GFP}</i>							<i>siRNA_{FAK}</i>				
Número	CT 11	1sem 8	2sem 10	3sem 8	6sem 8	12sem 9	SO 9	1sem 9	2sem 8	3sem 10	6sem 9	12sem 9
Hemodinâmica												
PAS _{CT} (mmHg)	112±4	167±5*	172±7*	168±8*	164±5*	167±6*	107±5	160±6*	157±5*	168±4*	166±6*	162±7*
PAS _{FE} (mmHg)		115±5	121±3	120±5	118±4	127±6		115±5	111±4	122±4	126±5	121±6
GrS (mmHg)		43±3	50±2	48±5	47±2	41±3		46±4	45±3	46±2	41±4	42±3
FC (bpm)	592±33	665±46	621±43	587±51	610±46	663±54	611±37	648±52	654±49	633±43	641±48	647±47
Ecocardiografia												
DDVE (mm)	3.4±0.1	4.0±0.3*	3.4±0.2	3.5±0.3	3.6±0.2*	3.9±0.3*	3.4±0.1	3.6±0.1*†	3.2±0.3*	3.5±0.2	3.7±0.4*	4.0±0.4*
DSVE (mm)	2.0±0.1	2.5±0.2*	1.9±0.2	2.0±0.3	2.1±0.2	2.4±0.2*	2.0±0.1	2.1±0.2	2.0±0.1	1.9±0.1	2.1±0.2	2.4±0.2*
EPVE (mm)	0.8±0.03	1.1±0.05*	1.3±0.06*	1.2±0.04*	1.2±0.04*	1.2±0.05*	0.8±0.01	0.8±0.02†	0.7±0.02†	0.8±0.03†	1.0±0.04*†	1.0±0.05*
FS (%)	43±1.3	35±0.9*	44±1.6	43±1.4	39±1.6*	37±1.9*	42±1.4	41±2.1†	48±1.4*†	43±1.9	40±1.7	41±2.0†
EPR	0.24±0.01	0.27±0.02	0.38±0.02*	0.34±0.02*	0.33±0.01*	0.31±0.04*	0.23±0.01	0.22±0.01	0.22±0.01†	0.23±0.01†	0.27±0.01†	0.25±0.01†
Morfometria												
Peso corporal (g)	30±1.0	27±1.1	29±0.9	28±0.9	30±1.1	40±1.7*	27±0.8	24±1.2	26±1.3	29±0.9	35±1.3	42±1.8*
IMVE (mg/g)	2.9±0.2	3.6±0.3*	3.8±0.4*	3.7±0.4*	3.9±0.4*	4.4±0.6*	2.7±0.3	2.8±0.4†	2.8±0.3†	2.9±0.4†	3.3±0.4*	4.1±0.5*
DCM (µm)	14±0.9	15±1.2	17±1.4*	17±1.2*	18±1.1*	17±1.2*	12±0.8	13±1.1	13±1.2	14±1.5	14±1.1	15±1.7
AI (%)	3.3±1.1	9.7±1.0*	8.9±0.5*	9.9±0.9*	7.2±0.6*	8.2±1.0*	3.2±0.5	4.7±0.5†	4.8±0.1†	5.0±0.5†	5.7±0.1*	7.2±1.1*

CT, controle sham (operação fictícia); 1, 2, 3, 6, 12 sem, semanas após constricção da aorta; PAS_{CT}, pressão arterial sistólica aferido na carótida; PAS_{FE}, pressão arterial sistólica aferida na femoral; GrS, gradiente sistólico; FC, frequência cardíaca; DDVE, diâmetro diastólico do VE; DSVE, diâmetro sistólico do VE; EPVE, espessura da parede do VE; FS, fração de encurtamento do VE; EPR, espessura relativa do VE; IMVE, índice de massa do VE; DCM, diâmetro do cardiomiócito; AI, área do interstício. * P<0.05 comparado aos valores dos animais CT. * P<0.05 comparado aos valores dos animais CT. † P<0.05 comparado aos valores dos animais coarctados tratados com siRNA_{GFP}.

As pressões na carótida e artéria femoral foram aferidas ao final dos períodos experimentais para confirmar se os animais estavam coarctados e também avaliar o efeito de siRNA_{FAK} na pressão arterial de camundongos. O gradiente sistólico através da constricção da aorta foi calculado através da diferença entre os valores de pressão sistólica da carótida e femoral. Como indicado na Tabela II e Figura 24, os animais coarctados tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} apresentaram pressões arteriais e gradientes sistólicos trans-constricção similares. Ainda, a pressão arterial e frequência cardíaca dos animais tratados com siRNA_{FAK} e submetidos à cirurgia fictícia (CT) mantiveram-se inalteradas, indicando que o *knockdown* da FAK não influencia a função cardíaca basal de animais normotensos. Desta maneira, os resultados obtidos dos camundongos sham tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e acompanhados por 6 semanas foram usados como controles (CT) para a comparação com os animais coarctados.

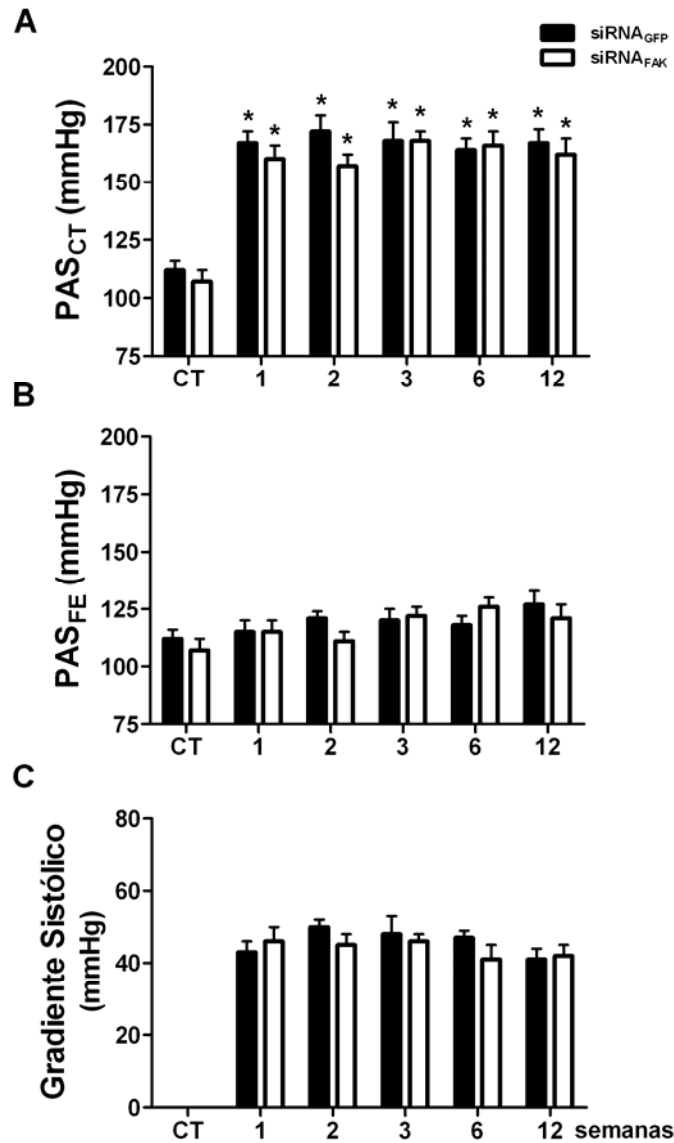


Figura 24- Análise hemodinâmica de camundongos Swiss tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} anterior à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais.

- A- Gráfico de barras indica os valores médios de PAS_{CT} (Pressão arterial sistólica aferida na carótida). *P<0/05 em relação ao CT.
- B- Gráfico de barras indica os valores médios de PAS_{FE} (Pressão arterial sistólica aferida na femoral).
- C- Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação.

Como apresentado na Tabela II, os camundongos foram examinados por ecocardiografia e tiveram as dimensões e função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) avaliadas.

Os grupos de camundongos controle sham tratados tanto com siRNA_{FAK} como com siRNA_{GFP} não mostraram mudanças significativas nas dimensões e função do VE ao longo do período experimental, indicando que o silenciamento do gene da FAK não afeta a estrutura basal e função do VE em camundongos. Assim, os parâmetros ecocardiográficos obtidos dos camundongos sham tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e acompanhados por 6 semanas foram usados como controles (CT) para a comparação com os animais coarctados.

Como apresentado na Figura 25, o tratamento com siRNA_{GFP} não afetou as mudanças típicas do VE induzidas por sobrecarga pressórica crônica apresentadas anteriormente na Figura 19.

O tratamento preventivo com siRNA_{FAK}, retardou e atenuou a hipertrofia do VE induzida pela constrição da aorta, como indicado pelos valores de EPVE e EPR (Tabela II). Este efeito foi observado por 3 semanas após o tratamento, coincidente com o *knockdown* do gene da FAK no miocárdio (Figura 22). O silenciamento transiente da FAK no miocárdio atenuou significativamente a dilatação do VE e a redução da fração de encurtamento após 1 semana de constrição da aorta. Em adição, aboliu a redução na fração de encurtamento embora não tenha alterado a dilatação do VE após 12 semanas de coarctação.

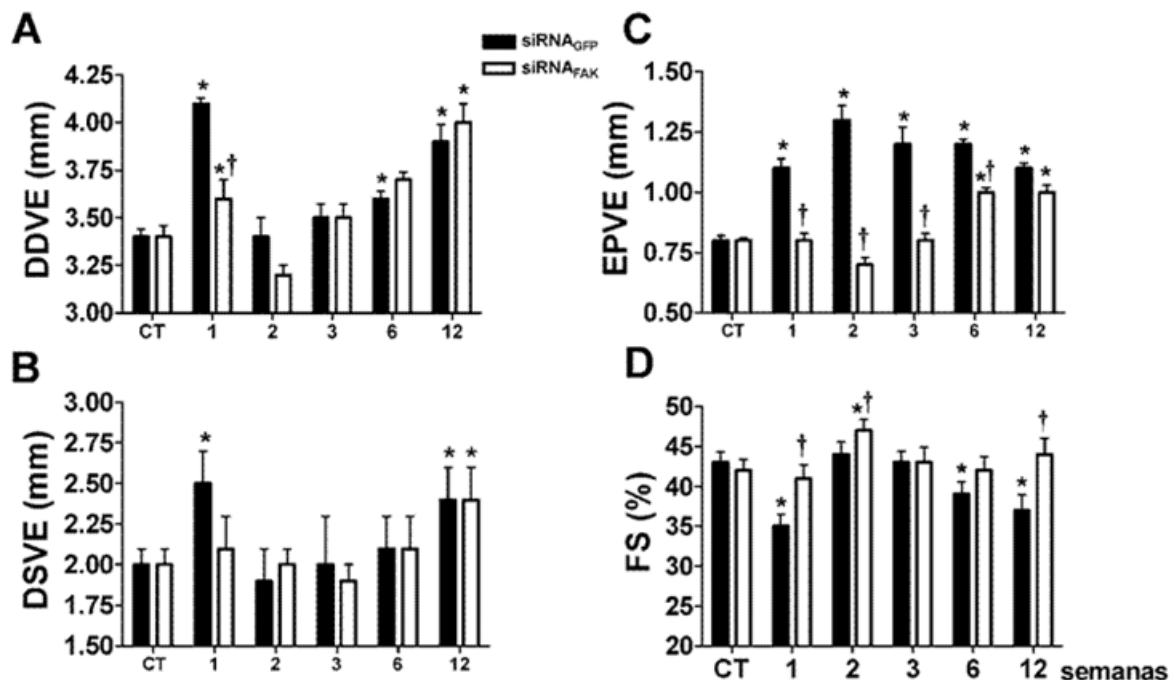


Figura 25- Análise ecocardiográfica do ventrículo esquerdo de camundongos Swiss tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à coarctação da aorta por diversos períodos experimentais.

- A- Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE (diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo) do VE. *P<0,05 em relação ao CT. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- B- Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE (diâmetro sistólico final do VE) do VE. *P<0,05 em relação ao CT.
- D- Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE (espessura da parede do ventrículo esquerdo). *P<0,05 em relação ao CT. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- E- Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS (% , fração de encurtamento) do VE. *P<0,05 em relação ao CT. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.3- Curva de crescimento

O crescimento de animais tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} previamente à coarctação da aorta foram acompanhados ao longo do período experimental. A Figura 26 mostra que, apesar dos camundongos tratados com siRNA_{FAK} apresentarem um fenótipo de hipertrofia cardíaca atenuada em condições de sobrecarga pressórica, não houve alteração de peso corporal dos animais tratados com siRNA_{FAK} em relação aos tratados com siRNA_{GFP}.

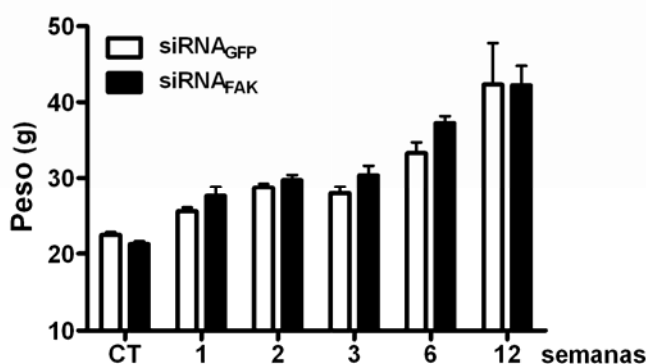


Figura 26- Curva de crescimento de camundongos tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} previamente à coarctação da aorta por diferentes períodos experimentais. N= 15.

3.3.4- Avaliação do marcador molecular de hipertrofia cardíaca β -MHC

A hipertrofia cardíaca é caracterizada pela reexpressão de genes fetais no miocárdio, como β -MHC, sendo estes empregados como marcadores moleculares na identificação deste processo. Desta maneira, a expressão de β -MHC no miocárdio dos camundongos foi avaliada por RT-PCR multiplex após 1, 2, 3, 6 e 12 semanas da injeção preventiva de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e coarctação da aorta ou cirurgia fictícia. A Figura 27, apresenta os valores percentuais médios de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos para GAPDH. Os camundongos tratados previamente com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e submetidos à cirurgia

fictícia (CT) não apresentaram variações significativas na expressão de β -MHC no miocárdio ao longo do período experimental. Desta maneira, o valor apresentado para comparações com os animais coarctados representa a média dos valores obtidos dos camundongos sham tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e acompanhados por 6 semanas.

A coarctação da aorta induziu a hipertrofia cardíaca e como parte integrante deste processo, o aumento da expressão de β -MHC, em cerca de 400%, nos animais coarctados tratados previamente com siRNA_{GFP}, quando comparados aos animais sham (CT). Este aumento foi mantido pelas 12 semanas acompanhadas. Em contraste, o tratamento preventivo com siRNA_{FAK} dos animais submetidos à constrição da aorta atenuou significativamente (~ 50%) o aumento da expressão de β -MHC no miocárdio destes animais nas semanas 1 e 2, quando comparados aos similares tratados com siRNA_{GFP}. A partir da semana 3, a expressão normalizada de β -MHC no miocárdio destes animais era equivalente à dos animais tratados com siRNA_{GFP}.

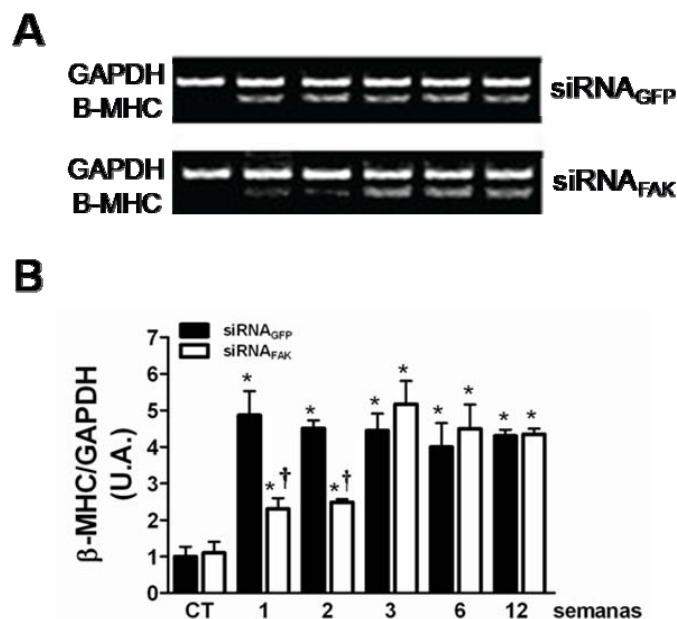


Figura 27- Avaliação da expressão de β -MHC no miocárdio de animais tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e submetidos à coarctação da aorta por diversos períodos experimentais.

A- Exemplos representativos de produtos de RT-PCR multiplex obtidos com oligonucleotídeos específicos para β -MHC e GAPDH.

B- Valores percentuais médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH. CT: animais submetidos à cirurgia fictícia. 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação da aorta. N=6. *P<0,05 em relação aos animais CT. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.5- Análise histológica do miocárdio

Após 1, 2, 3, 6 e 12 semanas da injeção preventiva de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e coarctação da aorta ou cirurgia fictícia, os animais foram sacrificados e secções histológicas de corações foram avaliadas. De acordo com a Figura 28 e Tabela II, a análise morfométrica dos animais pré-tratados com siRNA_{GFP} e submetidos à coarctação da aorta, em relação ao controle com cirurgia fictícia (CT), mostrou hipertrofia dos cardiomiócitos indicada pelo aumento do diâmetro médio. Em contrapartida, os animais tratados previamente com siRNA_{FAK} apresentaram redução no diâmetro médio dos cardiomiócitos, quando comparados àqueles tratados com siRNA_{GFP}.

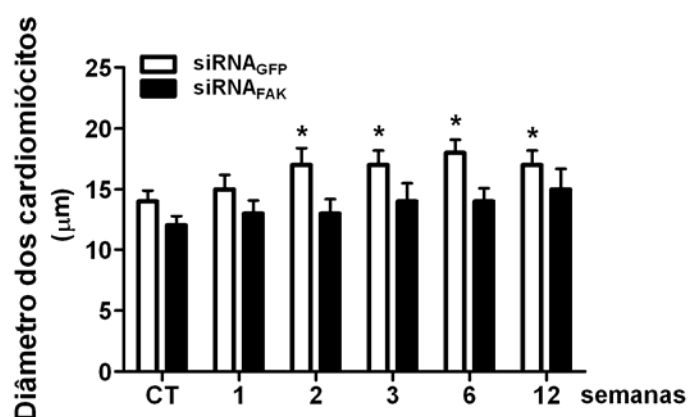


Figura 28- Análise morfométrica do VE de camundongos Swiss tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à coarctação da aorta por diversos períodos experimentais. Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia ou com 1 a 12 semanas após a coarctação da aorta. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação da aorta. *P<0,05 em relação ao CT. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

Na Figura 29 são apresentados exemplos representativos de secções histológicas de corações coradas com Tricrômico de Masson. A quantificação das áreas de fibrose no miocárdio dos grupos de camundongos controle sham tratados tanto com siRNA_{FAK} como com siRNA_{GFP} não mostraram mudanças significativas na área ocupada pelo tecido intersticial ao longo do período experimental, indicando que o silenciamento do gene da FAK não afeta a estrutura basal em camundongos. Assim, os valores obtidos dos camundongos sham tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e acompanhados por 6 semanas foram usados como controles (CT) para a comparação com os animais coarctados.

De acordo com a Figura 30 e Tabela II, a coarctação da aorta dos camundongos pré-tratados com siRNA_{GFP} induziu o aumento de 190% a área ocupada pelo tecido intersticial, em relação ao controle sham (CT), durante todo o período estudado. Contudo, observamos uma clara redução (de 50%) na área ocupada pelo tecido intersticial nos animais pré-tratados com siRNA_{FAK} e coarctados, em relação aos siRNA_{GFP}, por até 3 semanas após a coarctação da aorta. Após este período, houve o retorno gradativo aos níveis de fibrose observados nos animais tratados com siRNA_{GFP}.

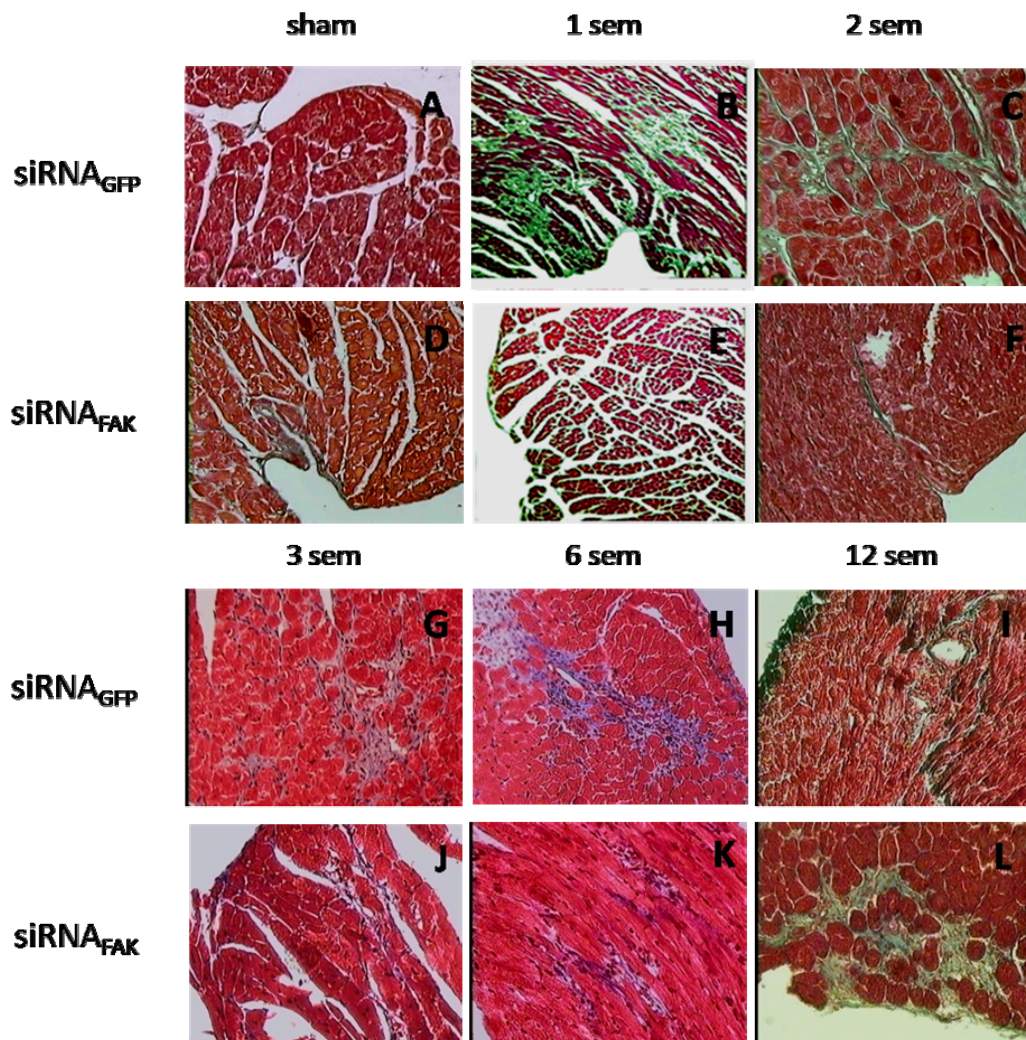


Figura 29- Exemplos representativos de secções histológicas de corações provenientes de camundongos coarctados tratados previamente com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e coradas com Tricrômico de Masson.

- A- Tratamento com siRNA_{GFP} e cirurgia fictícia (sham). 400x.
- B- Tratamento com siRNA_{GFP} e 1 semana de coarctação da aorta. 400x.
- C- Tratamento com siRNA_{GFP} e 2 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- D- Tratamento com siRNA_{FAK} e cirurgia fictícia (sham). 400x.
- E- Tratamento com siRNA_{FAK} e 1 semana de coarctação da aorta. 400x.
- F- Tratamento com siRNA_{FAK} e 2 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- G- Tratamento com siRNA_{GFP} e 3 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- H- Tratamento com siRNA_{GFP} e 6 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- I- Tratamento com siRNA_{GFP} e 12 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- J- Tratamento com siRNA_{FAK} e 3 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- K- Tratamento com siRNA_{FAK} e 6 semanas de coarctação da aorta. 400x.
- L- Tratamento com siRNA_{FAK} e 12 semanas de coarctação da aorta. 400x.

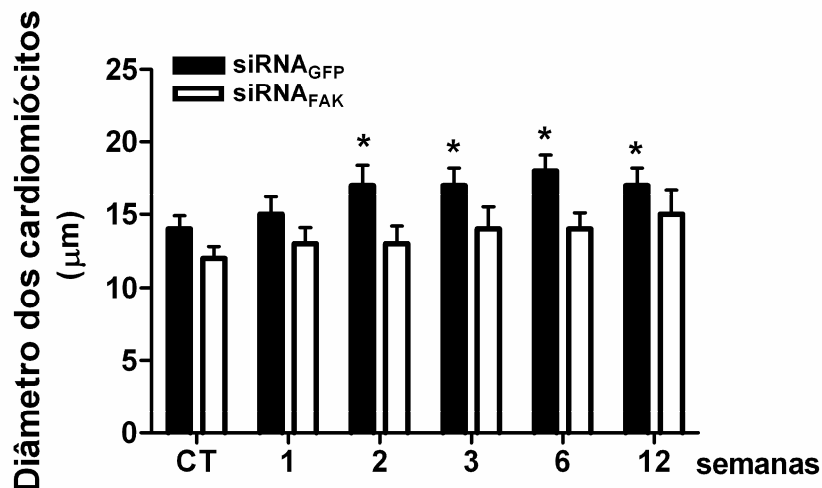


Figura 30- Análise quantitativa das áreas de fibrose no miocárdio de camundongos tratados previamente com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à coarctação da aorta. N=6. CT: animais submetidos à cirurgia fictícia. 1, 2, 3, 6 e 12 semanas: período de coarctação da aorta. *P<0,05 em relação aos animais controle. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.6- Análise de mecanismos relacionados a fibrose cardíaca em resposta ao estímulo mecânico

3.3.6.1- Avaliação do conteúdo de colágeno no VE (biossíntese)

Para verificar se o silenciamento transiente da FAK no miocárdio alterava a quantidade de fibrose nos animais coarctados devido a mudanças na biossíntese de colágeno, animais foram pré-tratados com siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} e submetidos à coarctação da aorta ou cirurgia fictícia. Após 1 semana, os animais foram sacrificados e o conteúdo de colágeno do miocárdio foi avaliado pelo método de hidroxiprolina.

Como ilustrado na Figura 31, o conteúdo de hidroxiprolina do VE de camundongos controle sham tratados com siRNA_{FAK} não mostrou mudança significativa no período estudado, indicando que o silenciamento do gene da FAK não afeta a estrutura cardíaca basal em camundongos.

A sobrecarga pressórica nos animais tratados com siRNA_{GFP} induziu o aumento de 110% no conteúdo de hidroxiprolina no miocárdio, em relação ao controle (CT). A atenuação da fibrose no miocárdio dos animais coarctados pré-tratados com siRNA_{FAK}, apresentada na Figura 30, foi acompanhada pela redução de 70% no aumento do conteúdo de hidroxiprolina nos corações destes animais, em relação aos siRNA_{GFP}.

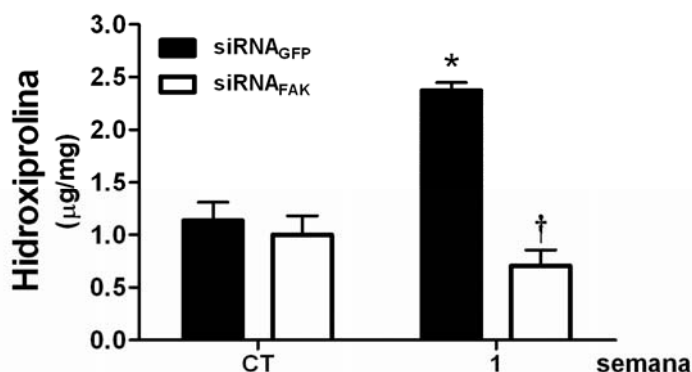


Figura 31- Análise do conteúdo de hidroxiprolina no VE de camundongos tratados previamente com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à 1 semana de sobrecarga pressórica. N=4. CT: animais submetidos à cirurgia fictícia. 1 semana: período de coarctação da aorta. *P<0,05 em relação aos animais controle. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.6.2- Avaliação da atividade de MMP-2 no VE

Metaloproteases (MMPs) são enzimas relacionadas ao processo fibrótico e possuem sua expressão e atividade aumentadas no coração em condições de estresse mecânico, já que o remodelamento é um processo dinâmico. Para avaliar a atividade da gelatinase MMP-2, após 5 dias da injeção preventiva de siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e coarctação da aorta ou cirurgia fictícia, os animais foram sacrificados e o VE coletado e analisado por zimografia.

De acordo com a Figura 32, camundongos controle sham tratados com siRNA_{FAK} não apresentaram mudanças significativas na atividade gelatinolítica de MMP-2 no período estudado. A coarctação da aorta induziu um aumento de 100% na atividade gelatinolítica da forma de MMP-2 intermediária nos animais coarctados tratados siRNA_{GFP}, em relação aos animais controle (CT). Em contraste, houve uma diminuição na atividade gelatinolítica das formas de MMP-2 intermediária e ativa nos animais coarctados tratados com siRNA_{FAK}, em relação aos coarctados tratados siRNA_{GFP}, com níveis de atividade semelhantes aos animais controle.

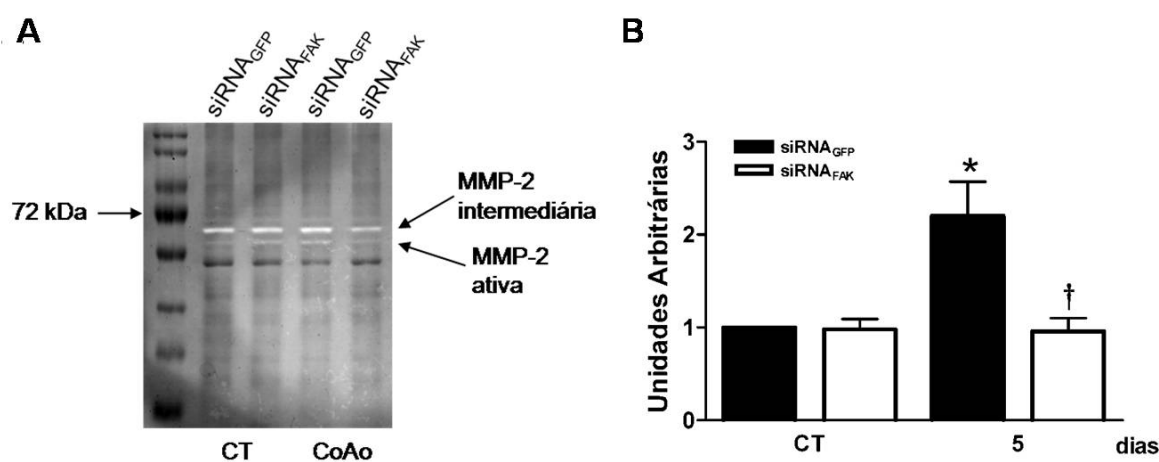


Figura 32- Avaliação da atividade de MMP-2 no miocárdio de animais pré-tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e coarctados por 5 dias.

A- Exemplos representativos de atividade genatinolítica de MMP-2. CT: cirurgia fictícia, CoAo: coarctação da aorta.

B- Valores percentuais médios de atividade zimográfica de MMP-2 intermediária. N=3. *P<0,05 em relação aos animais controle. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.3.6.3- Avaliação da expressão de MMP-2 em fibroblastos cardíacos

Como os fibroblastos são as principais células secretoras de MMPs no coração envolvidas com o processo de fibrose, experimentos foram realizados com células isoladas para verificar se a FAK atuava na regulação da expressão de MMP-2. Desta maneira, camundongos foram tratados previamente com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e submetidos à sobrecarga pressórica ou cirurgia fictícia. Após 7 dias, os animais foram sacrificados e os fibroblastos foram isolados dos corações. A expressão de FAK e MMP-2 foram avaliadas por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK e anti-MMP2. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de vimentina.

Como ilustrado na Figura 33, homogenatos de fibroblastos cardíacos de camundongos controle sham tratados com siRNA_{FAK} apresentaram silenciamento de 50% da FAK e nenhuma mudança significativa na expressão de MMP-2 no período estudado. A coarctação da aorta induziu aumento de 80% na expressão de FAK e de 120% na expressão de MMP-2 nos fibroblastos provenientes de animais coarctados tratados siRNA_{GFP}, em relação aos animais controle (CT). Fibroblastos cardíacos de animais coarctados tratados com siRNA_{FAK} mostraram *knockdown* da FAK em torno de 40%, em relação aos animais CT, acompanhado pela redução significativa da expressão de MMP-2 (~61%), em relação aos coarctados tratados com siRNA_{GFP}.

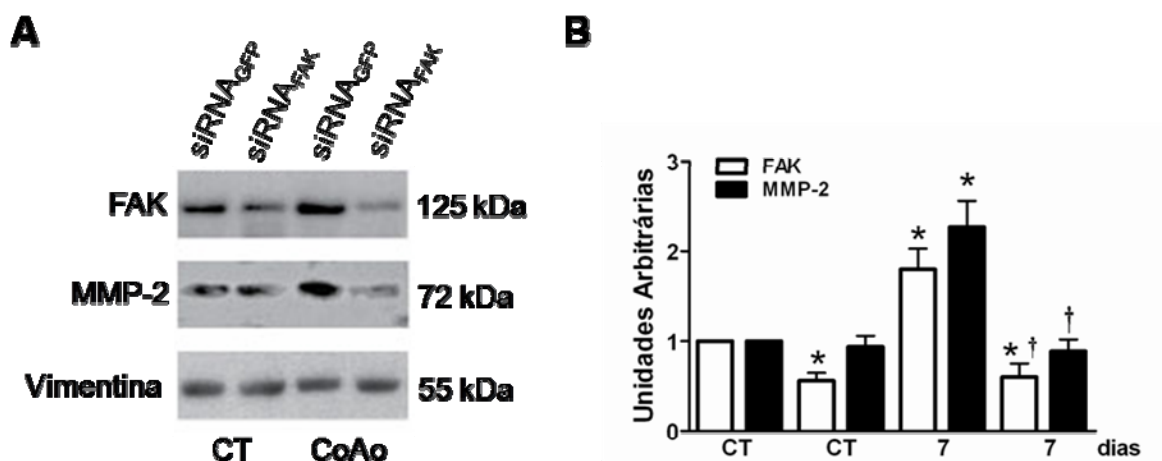


Figura 33- Avaliação da expressão de FAK e MMP-2 em fibroblastos isolados provenientes de camundongos pré-tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e coarctados por 7 dias.

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK, anti-MMP-2 e anti-vimentina. CT: cirurgia fictícia. CoAo: coarctação da aorta.

B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK ou MMP-2 normalizadas pela quantidade de vimentina no VE de camundongos. CT: cirurgia fictícia. 7 dias: período de coarctação. N=4. *P<0,05 em relação aos animais CT, †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.4- Avaliação do tratamento com siRNA_{fak} da hipertrofia cardíaca compensada induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos

Camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta foram utilizados para avaliar se a administração sistêmica de siRNA_{FAK} era capaz de reverter o fenótipo da hipertrofia cardíaca instalada. Estes animais foram escolhidos por apresentarem hipertrofia do VE compensada, com função do VE preservada, como indicado na análise ecocardiográfica apresentada na Tabela II. Assim, estes grupos de camundongos tiveram a veia jugular direita canulada e foram tratados com dose única de 15µg de siRNA_{FAK} ou 15µg de siRNA_{GFP} em 300µL de PBS. Os animais foram acompanhados por 1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a injeção ou 4, 5, 7, 10 e 16 semanas de coarctação da aorta, respectivamente. Camundongos controle sofreram cirurgia fictícia (sham). A expressão da FAK no miocárdio foi avaliada por western blotting, as dimensões e função do ventrículo esquerdo por ecocardiografia e a expressão do marcador de hipertrofia β -MHC por RT-PCR. As alterações histológicas do VE foram avaliadas por coloração tricrômico de Masson.

3.4.1- Avaliação do silenciamento do gene da FAK no miocárdio

Ao final do período experimental, os camundongos foram sacrificados e o silenciamento da FAK no VE foi confirmado por western blotting utilizando anticorpo específico anti-FAK. As amostras foram normalizadas pelos valores densitométricos de miosina cardíaca. Como apresentado na Figura 34, a expressão da FAK no VE dos animais coarctados tratados com siRNA_{GFP} aumentou 60% ao longo do período experimental, quando comparado aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. Por outro lado, uma única injeção intravenosa de siRNA_{FAK} foi capaz de reduzir significativamente a expressão da FAK no VE dos camundongos coarctados a níveis comparáveis aos dos animais normais mostrado anteriormente (Figura 12), em relação aos animais controle. Quando comparamos os animais tratados com siRNA_{GFP} e siRNA_{FAK}, observamos uma diminuição da expressão da FAK no miocárdio dos animais tratados com siRNA_{FAK} de 60%, 53%, 44% nas semanas 5, 6 e 7 respectivamente. Os níveis de expressão da FAK no VE retornou aos similares observados nos animais tratados com siRNA_{GFP} a partir da sexta semana após a injeção de siRNA_{FAK} ou décima semana de coarctação.

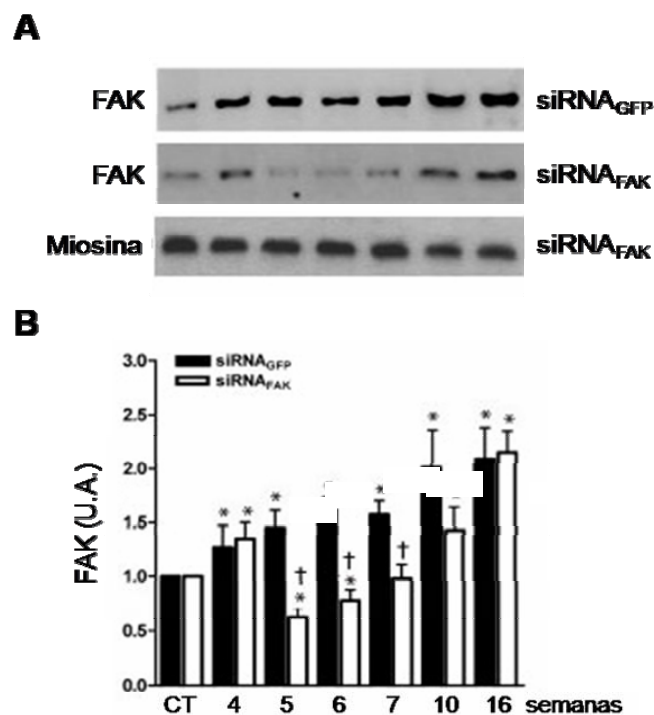


Figura 34- Curso temporal do silenciamento do gene da FAK no VE hipertrófico de camundongos tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK}

A- Exemplos representativos de blots realizados com homogenatos de corações de camundongos e anticorpos anti-FAK e anti-miosina.

B- Valores percentuais médios da quantidade de proteínas marcadas com FAK normalizada pela quantidade de miosina em miocárdio de camundongos. CT= cirurgia fictícia (sham). 4, 5, 6, 7, 10 e 16 semanas: período de coarctação da aorta. N=6. *P<0,05 em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.4.2- Análise hemodinâmica e ecocardiográfica do VE

Após 1, 2, 3, 6 e 12 semanas da injeção de siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP}, os camundongos foram submetidos à análise hemodinâmica e avaliação estrutural e funcional do VE através por ecocardiografia. Estes resultados são apresentados na Tabela III.

Para confirmar se os animais estavam coarctados, foram realizadas medidas de pressões na carótida e artéria femoral ao final do período de acompanhamento. O gradiente sistólico através da constricção da aorta foi calculado através da diferença entre os valores de pressão sistólica da carótida e femoral (Figura 35). De acordo com os resultados da Tabela III, os animais coarctados tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} apresentaram pressões arteriais e gradientes sistólicos similares.

Tabela 3- Avaliação hemodinâmica, ecocardiográfica e morfométrica de corações hipertróficos de camundongos tratados com siRNA

	siRNA _{GFP}								siRNA _{FAK}							
	4 sem	5 sem	6 sem	7 sem	10 sem	16 sem	4 sem	5 sem	6 sem	7 sem	10 sem	16 sem				
Número	8	7	8	8	7	6	7	8	7	7	8	8				
	Hemodinâmica															
PAS _{CT} (mmHg)	169±4	171±3	176±5	173±6	172±7	176±5	165±5	166± 5	178± 5	172± 5	171± 10	170±1				
PAS _{FE} (mmHg)	125±3	129± 2	126± 3	123± 3	127±5	126±4	123±4	118± 4	127± 4	121± 3	125± 4	124±5				
GrS (mmHg)	45±2	42±2	50±3	50±4	45±5	50±4	42±3	48±5	50±3	50±5	46±11	46±4				
FC (bpm)	586±47	614± 49	592±41	607± 46	677±54	659±61	557±39	584±42	574±52	611±47	595±56	623±44				
	Ecocardiografia															
DDVE (mm)	3.5±0.1	3.5±0.1	3.9±0.1*	4.1±0.3*	4.6±0.1*	4.9±0.1*	3.5±0.1	3.7 ± 0.1	3.9 ±0.1*	4.2 ±0.1*	4.1 ±0.1*	4.1±0.1*				
DSVE (mm)	1.9±0.1	1.8±0.1	2.2±0.1	2.3±0.1*	2.8±0.1*	3.0±0.1*	1.9±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.2±0.1†	2.3±0.2†				
EPVE (mm)	1.1±0.04	1.1±0.06	1.0±0.07	1.2±0.02	1.1±0.02	1.1±0.07	1.0±0.01	0.9±0.02*	0.9±0.02*†	0.8±0.02*†	0.8±0.03*†	0.9±0.06†				
FS (%)	47±1.0	48±1.3	45±1.9	44±2.3	38±1.9*	35±2.1*	47±1.1	48±0.7	47±0.9	48±1.6	48±1.6†	44±1.5†				
EPR	0.31±0.01	0.31±0.02	0.26±0.02	0.29±0.01	0.24±0.01*	0.22±0.01*	0.29±0.01	0.22±0.01*	0.23±0.01*	0.19±0.01*	0.19±0.01*	0.22±0.01*				
	Morfometria															
Peso corporal (g)	34±0.8	34±0.20	29±2.5	36±0.7	41±1.7*	42±2.3*	37±1.1	35±1.3	31±2.0	39±1.8	41±1.2*	46±2.2*				
IMVE (mg/g)	3.8±0.1	3.9±0.2	4.1±0.2	4.5±0.3	4.5±0.3	4.9±0.8*	3.7±0.1	3.0±0.2*	3.2±0.2*†	3.5±0.1†	3.4±0.1†	3.4±0.3†				
DCM (µm)	16 ± 0.7	18±0.9	17±0.8	18±0.8	17±0.9	17± 0.7	15 ± 0.5	13±0.7†	13±0.6†	14±0.8†	14±0.9†	15± 0.6†				
AI (%)	5.5± 0.1	5.5±0.1	6.3±0.6	7.7±0.6*	7.7±0.3*	7.8±0.3*	5.5± 0.1	3.8±0.4*†	3.9±0.4*†	3.2±0.1*†	4.3±0.3†	10± 1.0*				

CT, controle sham (operação fictícia); 1, 2, 3, 6, 12 sem, semanas após constricção da aorta; PAS_{CT}, pressão arterial sistólica aferido na carótida; PAS_{FE}, pressão arterial sistólica aferida na femoral; GrS, gradiente sistólico; FC, frequência cardíaca; DDVE, diâmetro diastólico do VE; DSVE, diâmetro sistólico do VE; EPVE, espessura da parede do VE; FS, fração de encurtamento do VE; EPR, espessura relativa do VE; IMVE, índice de massa do VE; DCM, diâmetro do cardiomiócito; AI, área do interstício. * P<0.05 comparado aos valores dos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. † P<0.05 comparado aos valores dos animais coarctados tratados com siRNA_{GFP}.

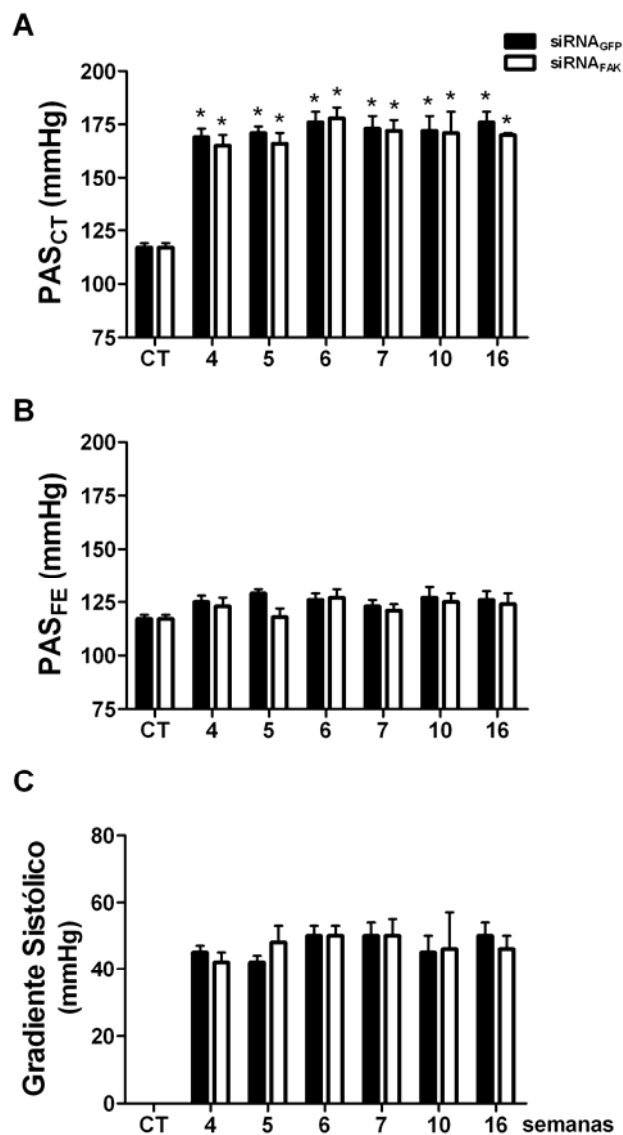


Figura 35- Análise hemodinâmica de camundongos Swiss com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e acompanhados por diversas semanas.

A- Gráfico de barras indica os valores médios de PAS_{CT} (Pressão arterial sistólica aferida na carótida). *P<0/05 em relação ao CT.

B- Gráfico de barras indica os valores médios de PAS_{FE} (Pressão arterial sistólica aferida na femoral).

C- Gráfico de barras indica os valores médios de gradiente sistólico. CT: cirurgia fictícia (sham). 1, 5, 6, 7, 10 e 16 semanas: período de coarctação da aorta.

Para a avaliação ecocardiográfica, inicialmente os animais com 4 semanas de coarctação da aorta foram anestesiados e tiveram as dimensões e função sistólica do ventrículo esquerdo aferidas. Logo após, foram tratados com 15µg de siRNA_{GFP} ou 15µg de siRNA_{FAK} e avaliados sequencialmente por 1, 2, 3, 6 e 12 semanas.

De acordo com os dados apresentados na Tabela III e Figura 36, o acompanhamento por 12 semanas dos animais tratados com siRNA_{GFP} mostrou as típicas deteriorações estruturais e funcionais do VE apresentadas anteriormente na Tabela II. A partir da décima semana de coarctação da aorta, observamos uma dilatação significativa de 37% no DDVE, em relação aos animais com 4 semanas de coarctação, indicando disfunção diastólica. Este processo foi acompanhado pela dilatação de 53% no DSVE e redução de 22% na %FS do VE, caracterizando o início da descompensação da hipertrofia cardíaca. A EPR diminuiu progressivamente nestes animais, indicando a mudança da hipertrofia do tipo concêntrica para ecêntrica.

O tratamento com siRNA_{FAK} foi acompanhado de regressão da hipertrofia do VE e melhora da função cardíaca dos animais apesar da persistência da sobrecarga pressórica, como indicado pelos valores dos parâmetros estruturais e funcionais do ventrículo esquerdo (Tabela III). O tratamento com siRNA_{FAK} levou a diminuição significativa de 20% na EPVE, em relação ao controle com 4 semanas de coarctação da aorta. Este efeito foi acompanhado por uma diminuição significativa no IMVE de 17% nas 2 primeiras semanas após o tratamento (semanas 5 e 6 de coarctação). Apesar da regressão da hipertrofia, houve uma redução na dilatação do DDVE e DSVE observadas a partir da décima semana de coarctação da aorta nos animais tratados com siRNA_{GFP} (11% e 21%, respectivamente). Ainda, a função sistólica do VE, avaliada pela %FS, foi preservada, em relação ao controle 4 semanas.

Assim, estes resultados indicam que o tratamento de camundongos com hipertrofia cardíaca com siRNA_{FAK} é capaz de induzir a regressão do fenótipo hipertrófico mesmo sob condições de sobrecarga pressórica, melhorando a função do ventrículo esquerdo quando comparado aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

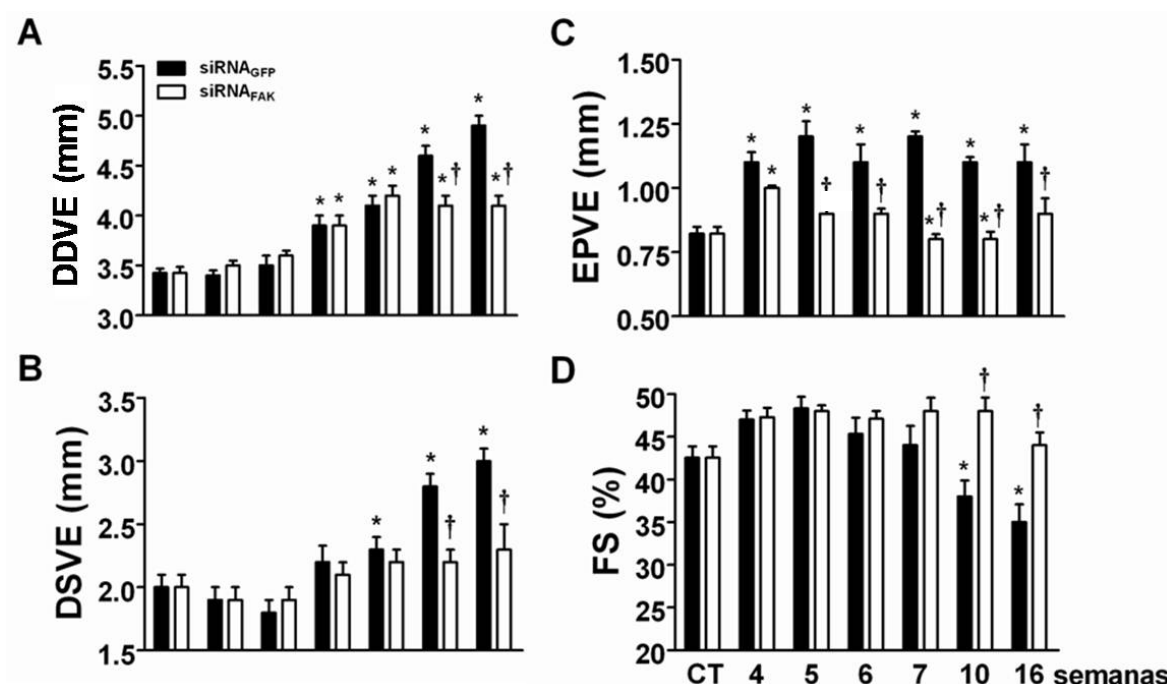


Figura 36- Análise ecocardiográfica de corações hipertróficos de camundongos tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e acompanhados por diversas semanas.

- A- Gráfico de barras indica os valores médios de DDVE (diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo) do VE. *P<0,05 em relação aos animais controle (CT). †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- B- Gráfico de barras indica os valores médios de DSVE (diâmetro sistólico final do VE) do VE. *P<0,05 em relação ao animais com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- C- Gráfico de barras indica os valores médios de EPVE (espessura da parede do ventrículo esquerdo). *P<0,05 em relação aos com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.
- D- Gráfico de barras indica os valores médios calculados de FS (% , fração de encurtamento) do VE. *P<0,05 em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.4.3- Curva de crescimento

O peso dos camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} foi acompanhado por 12 semanas. A Figura 37 mostra que, apesar dos camundongos tratados com siRNA_{FAK} apresentarem regressão do fenótipo da hipertrofia cardíaca em condições de sobrecarga pressórica, não houve diferença de peso corporal destes animais em relação aos controle tratados com siRNA_{GFP}.

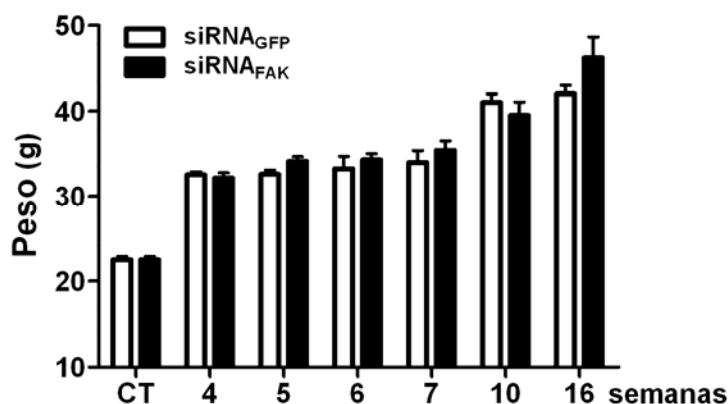


Figura 37- Curva de crescimento de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK}. N= 15.

3.4.4- Avaliação do marcador molecular de hipertrofia cardíaca β -MHC

Os camundongos com hipertrofia compensada foram tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e após 1, 2, 3, 6 e 12 semanas foram sacrificados e a expressão de β -MHC no VE foi avaliada por RT-PCR multiplex, através da razão β -MHC/GAPDH.

A Figura 38 apresenta os valores percentuais médios de produtos de RT-PCR com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos para GAPDH. O tratamento com siRNA_{GFP} não alterou a expressão normalizada de β -MHC no VE dos camundongos, em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta, ao longo do período experimental. Em contraste, o tratamento com siRNA_{FAK} atenuou

significativamente (~50%) o aumento da expressão de β -MHC no miocárdio destes animais nas semanas 1 e 2, quando comparados aos similares tratados com siRNA_{GFP}. A partir da semana 3, a expressão normalizada de β -MHC no miocárdio destes animais era equivalente à dos animais tratados com siRNA_{GFP}.

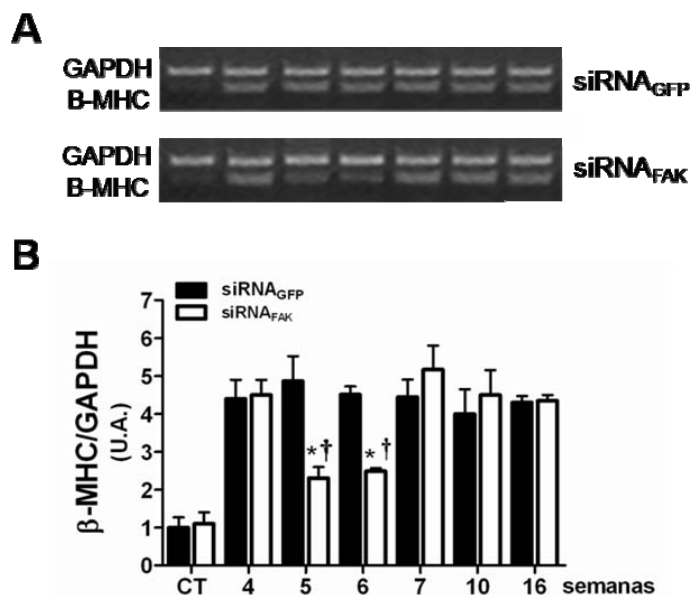


Figura 38- Avaliação da expressão de β -MHC no VE hipertrófico de camundongos com tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e acompanhados por diversas semanas.

A- Exemplos representativos de produtos de RT-PCR multiplex obtidos com oligonucleotídeos específicos para β -MHC e GAPDH.

B- Valores percentuais médios de produtos de RT-PCR multiplex com oligonucleotídeos específicos para β -MHC normalizados pelos valores obtidos com oligonucleotídeos específicos para GAPDH. CT: controle sham. 4, 5, 6, 7, 10 e 16 semanas: período de coarctação da aorta. N=6. *P<0,05 em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

3.4.5- Análise histológica do VE

1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a administração de siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} nos camundongos com hipertrofia compensada, os animais foram sacrificados e secções histológicas de corações foram avaliadas.

A análise morfométrica do VE dos animais tratados com siRNA_{GFP} (Figura 39) mostrou a sustentação da hipertrofia dos cardiomiócitos ao longo do período experimental, indicada pelo aumento do diâmetro médio, em relação aos animais controle (CT). Em contrapartida, os animais tratados com siRNA_{FAK} apresentaram redução no diâmetro médio dos cardiomiócitos, quando comparados aos similares tratados com siRNA_{GFP}.

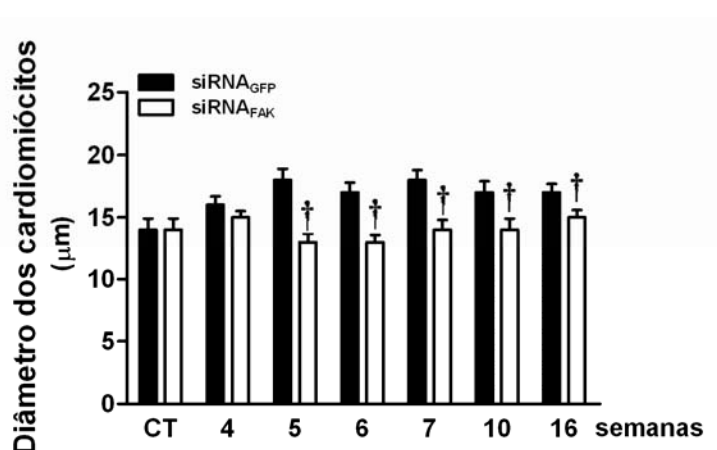


Figura 39- Análise morfométrica do VE hipertrófico de camundongos tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK}. Gráfico de barras indica os valores médios do diâmetro dos cardiomiócitos de VE de camundongos com cirurgia fictícia ou com 1 a 12 semanas após a administração de siRNA. CT: cirurgia fictícia (sham). 4, 5, 6, 7, 10 e 16 semanas: período de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}.

Na Figura 40 são apresentados exemplos representativos de secções histológicas de corações de camundongos coradas com Tricrômico de Masson. De acordo coma Figura 41 e Tabela III, os camundongos tratados com siRNA_{GFP} apresentaram aumento de 40% na densidade do interstício, em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta, a partir da sétima semana de constricção. Contudo, podemos observar uma redução significativa na área ocupada por fibrose nos animais tratados com siRNA_{FAK}, em relação aos animais equivalentes tratados com siRNA_{GFP}, de 31%, 38%, 58% e 44% nas semanas 5, 6, 7 e 10 de coarctação da aorta, respectivamente. Na semana 12 após a administração de siRNA_{FAK} ou 16 de coarctação da aorta, a área ocupada pelo tecido intersticial no VE não diferia dos animais similares tratados com siRNA_{GFP}.

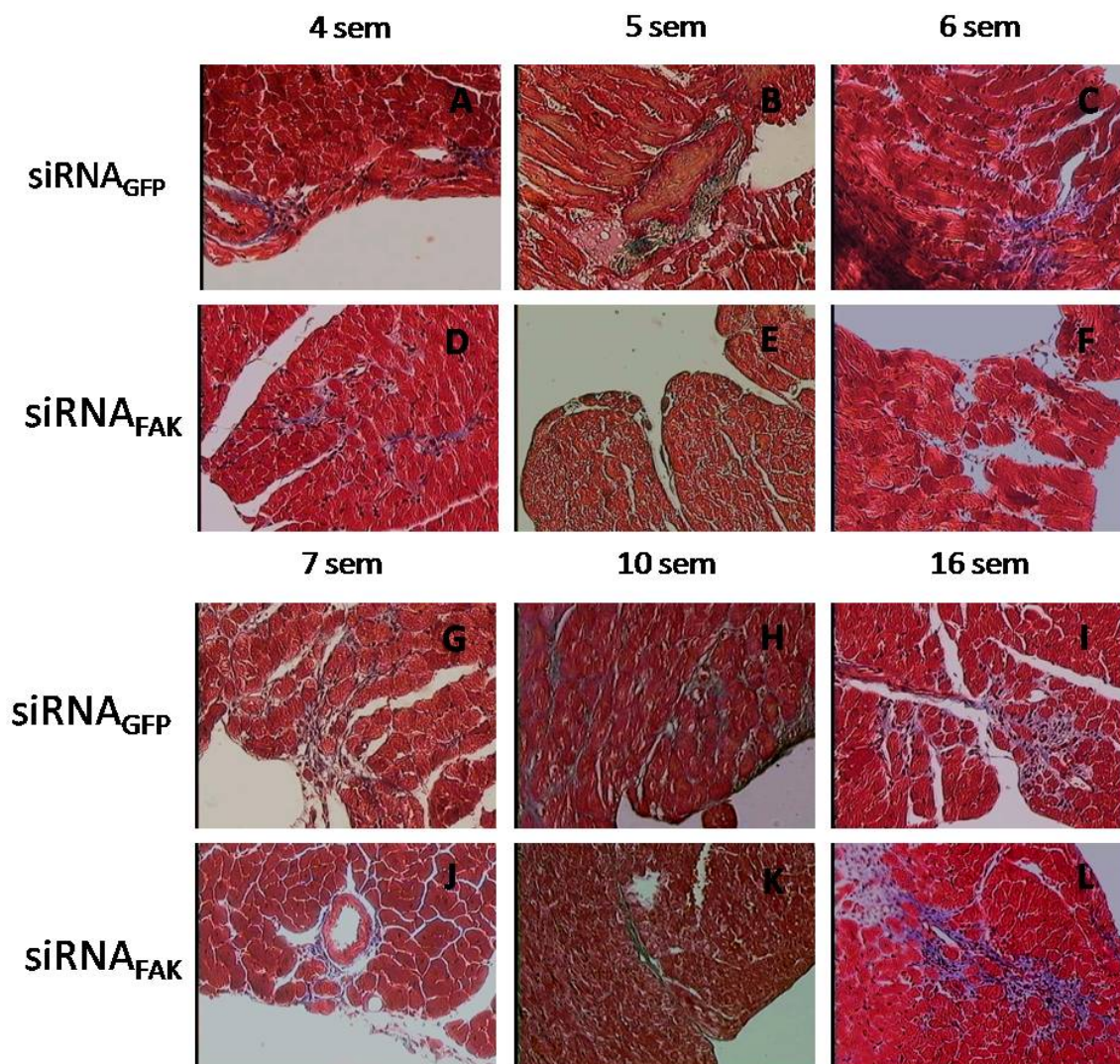


Figura 40- Exemplos representativos de corações provenientes de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e corados com Tricrômico de Masson.

A- Miocárdio proveniente de camundongo com 4 semanas de coarctação da aorta. 400x.

B- Miocárdio proveniente de camundongo com 5 semanas de coao e 1 semana de tratamento com siRNA_{GFP}. 400x.

C- Miocárdio proveniente de camundongo com 6 semanas de coao e 2 semanas de tratamento com siRNA_{GFP}. 400x.

D- Miocárdio proveniente de camundongo com 4 semanas de coarctação da aorta. 400x.

- E- Miocárdio proveniente de camundongo com 5 semanas de coao e 1 semana de tratamento com siRNA_{FAK}. 400x.
- F- Miocárdio proveniente de camundongo com 6 semanas de coao e 2 semanas de tratamento com siRNA_{FAK}. 400x.
- G- Miocárdio proveniente de camundongo com 7 semanas de coao e 3 semanas de tratamento com siRNA_{GFP}. 400x.
- H- Miocárdio proveniente de camundongo com 10 semanas de coao e 6 semanas de tratamento com siRNA_{GFP}. 400x.
- I- Miocárdio proveniente de camundongo com 16 semanas de coao e 12 semanas de tratamento com siRNA_{GFP}. 400x.
- J- Miocárdio proveniente de camundongo com 7 semanas de coao e 3 semanas de tratamento com siRNA_{FAK}. 400x.
- K- Miocárdio proveniente de camundongo com 10 semanas de coao e 6 semanas de tratamento com siRNA_{FAK}. 400x.
- L- Miocárdio proveniente de camundongo com 16 semanas de coao e 12 semanas de tratamento com siRNA_{FAK}. 400x.

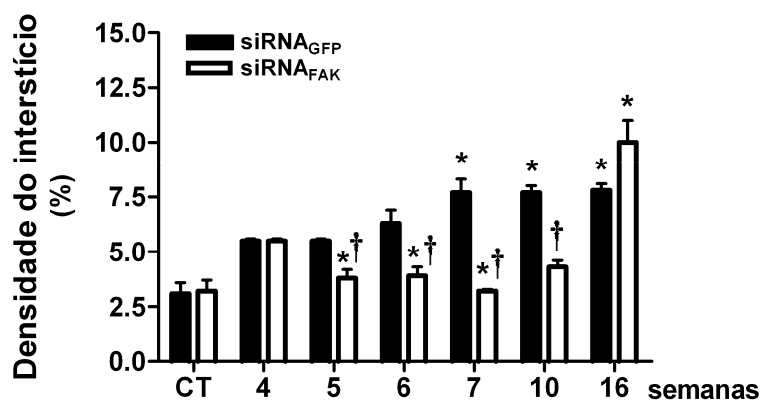


Figura 41- Análise quantitativa das áreas de fibrose no VE de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK}. CT: animais submetidos à cirurgia fictícia. 4, 5, 6, 7, 10, 16 semanas: período de coarctação da aorta. *P<0,05 em relação aos animais com 4 semanas de coarctação da aorta. †P<0,05 em relação aos animais tratados com siRNA_{GFP}

3.4.6- Curva de mortalidade

Visando aplicação terapêutica do siRNA_{FAK}, uma vez que sua administração mostrou regredir a hipertrofia instalada e melhorar a função do VE, foi acompanhada a mortalidade dos camundongos. A Figura 42 mostra que, a sobrevivência dos animais tratados siRNA_{FAK} é significativamente maior do que daqueles tratados com siRNA_{GFP}.

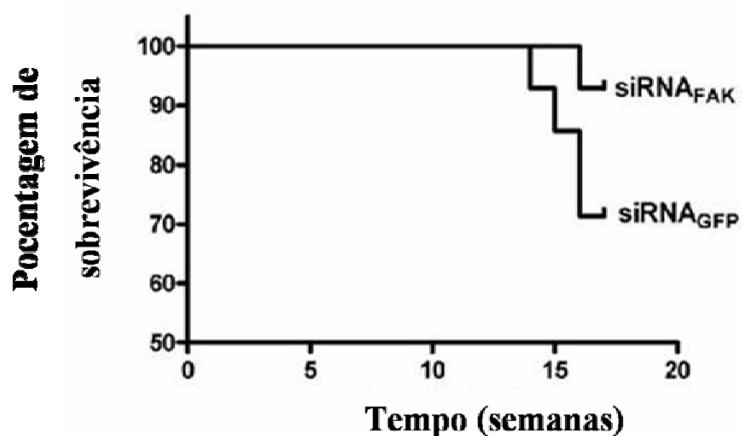


Figura 42- Curva de mortalidade de camundongos com 4 semanas de coarctação da aorta tratados com siRNA_{GFP} ou siRNA_{FAK} e acompanhados por 1, 2, 3, 6 e 12 semanas após a injeção de siRNA ou 5, 6, 7, 10 e 16 semanas de coarctação da aorta.

4- DISCUSSÃO

Recentemente, houve um grande progresso no entendimento da função da FAK no crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo provocado por estímulos mecânicos. Esta é uma questão importante dada a sua relevância clínica pois a presença da hipertrofia cardíaca em doenças, como hipertensão, é determinante de mal prognóstico. Porém, os dados atuais obtidos em camundongos com deleção condicional da FAK, dirigida pelo promotor da miosina de cadeia leve 2v (PENG et al., 2006; DIMICHELE et al., 2006), para avaliar a importância da FAK na instalação da hipertrofia adaptativa cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica foram discrepantes e inconclusivos. Em longo prazo, se a FAK é importante na prevenção ou contribui para a deterioração da função cardíaca ainda é um ponto a ser esclarecido (BAYER et al., 2002; DIMICHELE et al., 2006; LOPES et al., 2007). Assim, estes resultados conflitantes e as limitações impostas pela deleção de FAK restrita aos cardiomiócitos excluem um melhor entendimento da importância da sinalização da FAK na fisiopatologia complexa da hipertrofia e sua progressão para a insuficiência cardíaca decorrente da resposta à sobrecarga mecânica.

A habilidade de siRNAs sintéticos administrados de modo sistêmico em reduzir eficientemente a expressão de proteínas alvo específicas foi demonstrada em alguns poucos modelos de doenças em pequenos roedores (McCAFFREY et al., 2002; SONG et al., 2003; ZENDER et al., 2003; CONTRERAS et al., 2004; TOMPKINS ET AL., 2004; BRADLEY et al., 2005). Neste estudo, o silenciamento transiente do gene da FAK no miocárdio permitiu a definição de um papel para esta molécula de sinalização na fisiopatologia complexa da hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por sobrecarga pressórica e seu progresso para o remodelamento maladaptativo.

Seis achados principais sustentam esta conclusão: (1) o silenciamento gênico da FAK atenuou o crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos e da expressão do marcador molecular de hipertrofia β -MHC no VE de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica, (2) o silenciamento da FAK atenuou o aumento da fibrose intersticial, conteúdo de colágeno, expressão e atividade de MMP-2 no VE submetido ao estímulo mecânico, (3) a função do VE foi preservada nos animais tratados com siRNA_{FAK}, apesar da persistência da sobrecarga pressórica, (4) o silenciamento da FAK reverteu o fenótipo de hipertrofia cardíaca de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica, apesar da

persistência do estímulo mecânico, (5) o silenciamento da FAK retardou o remodelamento maladaptativo cardíaco nos animais tratados com siRNA_{FAK}, (6) a taxa de sobrevivência foi maior nos camundongos tratados com siRNA_{FAK}.

Desta maneira, o silenciamento transiente da FAK mostrou prevenir assim como reverter a hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida por sobrecarga pressórica em camundongos. Ainda, o silenciamento do gene da FAK também demonstrou atenuar e retardar as anormalidades estruturais e funcionais tardias da hipertrofia do ventrículo esquerdo, apesar da persistência da sobrecarga pressórica.

4.1- Silenciamento do gene da FAK *in vivo* por iRNA

A injeção hidrodinâmica em camundongos foi o método pioneiro empregado na administração sistêmica de siRNA não modificado *in vivo* (McCAFFREY et al., 2002; LEWIS et al., 2002). Neste método, é feita uma injeção rápida e de grande volume de solução de siRNA na veia caudal de camundongos. Com o fluxo dinâmico, há o desenvolvimento de uma pressão hidrostática alta na veia cava inferior, forçando o fluxo da solução de siRNA para tecidos como fígado e rim, que são diretamente ligados a veia cava inferior. Como o fígado é o maior órgão e com uma estrutura expansível, uma grande quantidade de siRNA é forçada no fígado em uma direção oposta à circulação normal, resultando na exposição direta das moléculas de siRNA nas células do fígado antes da sua distribuição para os outros tecidos (LEWIS & WOLFF, 2007).

Desta maneira, este método visa a entrega de siRNA preferencialmente ao fígado, rim, baço e pâncreas; com menor eficiência nos outros órgãos (LIU et al., 1999). Neste estudo demonstramos que a injeção de siRNA_{FAK} na veia caudal não alterou a expressão da FAK no VE de camundongos. Desta maneira, a principal barreira para o uso de iRNA em mamíferos é a dificuldade de absorção de siRNA no tecido desejado.

Atualmente, tem se demonstrado que a absorção de siRNAs pode ser alcançada através da injeção na vasculatura local do tecido de interesse (ZHANG et al., 2002; CONTRERAS et al., 2004; HAGSTROM et al., 2004). Neste estudo, desenvolvemos um método eficaz de administração de siRNA não modificado no coração através da injeção na

veia jugular direita de camundongos adultos. Demonstramos que injeções intravenosas únicas de siRNA específico fornecem uma redução prolongada (~70-50%, 15 dias) na expressão da FAK no VE normal e também no hipertrófico de camundongos. O silenciamento da FAK foi confirmado nos cardiomiócitos (~80%) e fibroblastos (~67%) isolados provenientes de corações de camundongos após 14 horas da injeção siRNA_{FAK}, sugerindo que populações celulares cardíacas de miócitos e não-miócitos podem ser igualmente susceptíveis ao silenciamento gênico pela estratégia de RNAi utilizada.

Assim, estes resultados indicam a possibilidade do emprego da metodologia de RNAi no silenciamento de genes no coração de camundongos adultos, pelo emprego da infusão de solução de siRNA não modificado pela veia jugular, apesar de siRNAs não modificados possuírem meia vida curta (de segundos a minutos) na circulação (SOUTSCHEK et al., 2004). Esta propriedade dos siRNAs não modificados deve-se a sua eliminação rápida por filtração pelos rins, por causa do seu tamanho pequeno (7kDa), e pela baixa resistência a nucleases (SORENSEN et al., 2003; DYKXHOORN et al., 2006).

Outro fator limitante da estratégia de iRNA em mamíferos é a pobre absorção celular de siRNAs não modificados. Tem se demonstrado que é possível ultrapassar este obstáculo administrando comparativamente grandes quantidades de siRNA seletivamente no órgão onde ele precisar ser entregue (BRIDGE et al., 2003; MODLINGER et al., 2006). De acordo, demonstramos que uma estratégia modificada de injeção local, isto é, uma injeção em bolus de siRNA comparativamente concentrado na veia jugular, em relação a veia caudal, foi eficaz na redução da expressão da FAK no VE de camundongos. O silenciamento relativamente modesto da FAK no rim e a ausência de silenciamento no fígado, bem como a demonstração de que injeção hidrodinâmica de siRNA_{FAK} pela veia caudal não altera a expressão da FAK no VE dão suporte a eficiência da administração de siRNA não modificado pela veia jugular na indução do silenciamento gênico cardíaco *in vivo*.

Contudo, a quantidade relativamente grande de siRNA_{FAK} necessária para obter um silenciamento gênico eficiente no VE pode induzir respostas não específicas e efeitos *off-targets*, limitando o uso desta estratégia. Neste contexto, o principal efeito inespecífico relacionado à administração de siRNAs em mamíferos é a indução da resposta imunogênica

por interferon, causando inibição global e não-específica da tradução de proteínas (LEUNG & WHITTAKER, 2005). Apesar de siRNAs com sequência inferior a 30 nucleotídeos não causarem resposta por interferon (ELBASHIR et al., 2001), ela pode ser ativada pelo uso de concentrações altas de siRNA (BRIDGE et al., 2003; PERSENGIEV et al., 2004).

Neste estudo demonstramos que a administração sistêmica de 15µg de siRNA_{FAK} não induziu a expressão de interferon gama no plasma de camundongos. Este dado está de acordo com resultados publicados recentemente que indicam que siRNAs não dão origem a uma resposta intensa de interferon em células de mamíferos. Ainda, que o uso de siRNA não modificado inibe a resposta por interferon em camundongos (HEIDEL et al., 2004), sendo os principais efeitos inespecíficos relacionados com a administração sistêmica de siRNA devidos ao reagente de transfecção baseado em lipídeos e não ao siRNA em si (FEDOROV et al., 2005; JUDGE et al., 2005).

Em 2005, Judge et al. mostraram que a atividade imunogênica e toxicidade de alguns siRNAs eram dependentes da sua sequência de nucleotídeos e, assim, definiram como motivos imuno-estimulatórios as sequências ricas em GU e poliU. Estas sequências podem induzir indiretamente a produção de interferon pela ligação a receptores do tipo Toll (TLR3, TLR7 e TLR8), que alertam as células do sistema imune para a presença de RNA de patógenos virais (KARIKO et al., 2004; HORNUNG et al., 2005). Não foram encontrados os motivos imunogênicos mencionados na análise da sequência dos siRNAs utilizados (FAK e GFP).

O efeito principal *off-target* relacionado à siRNAs é o reconhecimento de outros RNAm que possuem complementariedade apenas parcial com a fita antisenso, ocasionando a inibição da expressão gênica de outras proteínas além da proteína de interesse (JACKSON et al., 2003; SAXENA et al., 2003). Neste contexto, demonstramos que o tratamento com siRNA_{FAK} não afeta a expressão no miocárdio da FAK-relacionada PYK2 ou das proteínas não relacionadas miosina e ERK ½, sugerindo a falta de efeitos *off-targets* nesta sequência. Em adição, a análise *in silico* da sequência do siRNA_{FAK} em banco de dados (NCBI) indicou homologia com outras sequências gênicas não superiores a 5%, o que minimiza a chance de efeitos *off-targets* por esta sequência.

Ao avaliarmos o curso temporal do silenciamento gênico da FAK no miocárdio, apenas após a terceira semana da injeção de siRNA_{FAK} os transcritos e a expressão da proteína FAK voltaram aos níveis observados no VE de camundongos que foram tratados com siRNA_{GFP}. Embora não esperássemos este efeito prolongado, observações anteriores indicaram que o silenciamento gênico induzido por siRNA não modificado pode ser efetivo por semanas (PALLISER et al., 2006; ZIMMERMANN et al., 2006). Este efeito prolongado pode ser atribuído a estabilidade da interação da fita ativa de siRNA com o complexo RISC, a qual pode persistir por semanas, dependendo da taxa de divisão celular e da presença do RNAm alvo dentro das células (SONG et al., 2003A; SONG et al., 2003B). Neste contexto é bom mencionar que os cardiomiócitos não proliferam a taxas significativas em corações normais ou doentes, eliminando a perda de siRNA pela diluição do ambiente intracelular, embora os outros tipos celulares possam proliferar em resposta ao estímulo fisiopatológico. De maneira interessante, siRNA_{FAK} reduziu a expressão miocárdica de FAK a níveis comparáveis no VE de animais controle e coarctados, indicando que as influências tróficas da sobrecarga pressórica não afetam a eficiência do siRNA no silenciamento de FAK no miocárdio.

4.2- FAK e hipertrofia

4.2.1- Modelo de coarctação da aorta em camundongos

A coarctação da croça da aorta em camundongos é um modelo que tem sido rotineiramente utilizado em estudos de hipertrofia cardíaca. Neste modelo, há um rápido crescimento hipertrófico do VE em resposta à sobrecarga pressórica, evoluindo para a insuficiência cardíaca.

Ao avaliarmos as alterações estruturais e funcionais dos corações de camundongos submetidos à coarctação da aorta, demonstramos que a hipertrofia concêntrica compensada inicialmente instalada evoluía para a descompensação, com dilatação e disfunção sistólica do VE.

Neste estudo, avaliamos a expressão e atividade (fosforilação da tirosina 397) da FAK no miocárdio hipertrófico de camundongos submetidos à coarctação da aorta crônica. É importante salientar, que os estudos anteriores do nosso laboratório que avaliaram a expressão e atividade da FAK no VE de ratos restringiram a análise a tempos agudos de até 1 hora após o início da sobrecarga pressórica (FRANCHINI et al., 2000; DOMINGOS et al., 2002).

Demonstramos o aumento na expressão e picos de atividade da FAK no miocárdio hipertrófico de camundongos após a constrição da aorta. Estes picos de atividade da FAK coincidiam com a dilatação e disfunção do VE (descompensação da hipertrofia) observados por ecocardiografia. Estes resultados estão de acordo com Bayer et al., 2002, que demonstraram aumento na expressão e atividade de FAK na hipertrofia compensada e na transição para a insuficiência cardíaca em ratos submetidos à coarctação crônica da aorta abdominal.

A hipertrofia do VE induzida por sobrecarga pressórica foi acompanhada pelo aumento da fibrose miocárdica. Através de estudos imunohistoquímicos, demonstramos que a forte marcação anti-FAK nos cardiomiócitos em corações normais foi alterada para as regiões correspondentes a fibrose intersticial no VE hipertrófico. Esta observação está de acordo com estudos anteriores em VE hipertrófico de ratos e humanos (BAYER et al., 2002; LOPES et al., 2007), sugerindo o aumento da atividade da FAK nas células do interstício.

4.2.2- Avaliação da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos previamente tratados com siRNA_{FAK}

Um dos achados principais deste estudo foi que reduções transientes da expressão da FAK no miocárdio pela estratégia de iRNA atenuou o desenvolvimento da hipertrofia do VE em camundongos submetidos à coarctação da aorta. Isto implica que FAK é necessária para o desenvolvimento da hipertrofia do VE em resposta a sobrecarga pressórica crônica.

Neste estudo demonstramos que uma única injeção intravenosa de siRNA_{FAK}, via veia jugular, foi capaz de produzir uma redução prolongada (~67-45%, 15 dias) na expressão da FAK no VE de camundongos posteriormente submetidos à coarctação da aorta. Esta redução na expressão gênica da FAK foi comparável a dos animais normais tratados com siRNA_{FAK}. Desta maneira, o siRNA_{FAK} parece atuar de maneira semelhante no miocárdio normal e hipertrófico, indicando que as influências tróficas da sobrecarga pressórica não afetam a eficiência do siRNA_{FAK} em silenciar a FAK no miocárdio. O *knockdown* da FAK foi acompanhado da redução da atividade da sinalização da FAK no miocárdio, avaliada por anticorpo fosfo-específico anti-tirosina 397, o principal resíduo determinante da atividade quinase da FAK.

A análise do silenciamento gênico da FAK no VE de camundongos posteriormente submetidos à cirurgia fictícia (sham) mostrou que a FAK parece ser dispensável para a estrutura e função cardíaca basal. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores gerados em camundongos jovens *knockout* da FAK restrito aos miócitos que indicaram que a FAK não é requerida para a arquitetura dos cardiomiócitos e função cardíaca basal (DIMICHELE et al., 2006).

A redução na expressão da FAK no VE foi paralela a atenuação do crescimento hipertrófico dos cardiomiócitos e da expressão do marcador molecular de hipertrofia β -MHC em resposta ao estímulo mecânico. Estas observações dão suporte a conclusão de que o silenciamento da FAK atenua o crescimento hipertrófico afetando as respostas dos cardiomiócitos à sobrecarga pressórica. Este resultado está de acordo com dados anteriores que indicam que a FAK está envolvida na resposta hipertrófica de cardiomiócitos ao estresse mecânico (TORSONI et al., 2003; NADRUZ et al., 2005; DIMICHELE et al., 2006; PENG et al., 2006).

Contudo, as influências geradas como consequência do silenciamento da FAK nos vasos da circulação periférica ou fatores neuro-humorais podem contribuir para a atenuação da hipertrofia do VE em animais coarctados previamente tratados com siRNA_{FAK}. Embora não podemos excluir o silenciamento gênico da FAK significativo na vasculatura sistêmica nem a redução na resistência vascular em camundongos coarctados tratados com siRNA_{FAK}, a demonstração de que camundongos coarctados tratados com

siRNA_{FAK} ou siRNA_{GFP} possuíam gradientes sistólicos trans-coarctação e aumentos na pressão sanguínea na carótida comparáveis indicam ser improvável que reduções na resistência vascular contribuíram substancialmente para a atenuação do crescimento hipertrófico nos camundongos tratados com siRNA_{FAK}. Estudos futuros serão necessários para examinar se mudanças na microcirculação coronária ou na atividade de sistemas neuro-humorais (como o sistema renina-angiotensina) contribuem para o efeito anti-hipertrófico da silenciamento miocárdico da FAK.

Estudos funcionais do VE ainda apontaram que o silenciamento transitório da FAK atenuou o crescimento hipertrófico compensatório do VE em resposta a sobrecarga pressórica, preservando a função sistólica cardíaca dos animais. Isto conflita, aparentemente, com as observações em camundongos com depleção da FAK restrito aos miócitos (PENG et al., 2006, DIMICHELE et al., 2006), que indicaram que a depleção da FAK predisponha ao remodelamento maladaptativo do VE submetido à sobrecarga pressórica crônica, associado ao aumento da fibrose intersticial e perivascular. Porém, neste estudo demonstramos que o silenciamento da FAK foi paralelo a redução na área ocupada pelo interstício no coração de camundongos submetidos à coarctação da aorta.

Desta maneira, sugerimos que os efeitos contrastantes possam estar relacionados com a resposta dos miócitos e dos fibroblastos cardíacos ao estímulo mecânico. Nos cardiomiócitos, o silenciamento da FAK poderia favorecer a melhor organização dos sarcômeros e funcionalidade das mitocôndrias dos cardiomiócitos submetidos à sobrecarga mecânica, resultando na preservação da função cardíaca dos camundongos. Estudos futuros serão necessários para analisar estes aspectos.

Por estarem envolvidos diretamente com o processo de fibrose cardíaca, o silenciamento da FAK nos fibroblastos, em adição aos cardiomiócitos, pode atenuar o desenvolvimento da fibrose, favorecendo uma melhor resposta do VE submetido à sobrecarga pressórica crônica. A redução da expressão da FAK nos fibroblastos cardíacos é a principal diferença entre o modelo apresentado neste estudo e os camundongos *knockout* restrito aos miócitos (PENG et al., 2006, DIMICHELE et al., 2006).

Neste contexto, mostramos que a fibrose miocárdica em corações hipertróficos apresentava marcação anti-FAK, sugerindo a ativação da sinalização da FAK nos sítios de fibrose, como indicado anteriormente em VE hipertróficos de ratos e humanos (BAYER et al., 2002; LOPES et al., 2007). Demonstramos que fibroblastos extraídos do VE de camundongos tratados com siRNA_{GFP} e submetidos à 7 dias de coarctação da aorta possuíam aumento na expressão da FAK. Em contrapartida, fibroblastos provenientes de corações de camundongos equivalentes tratados com siRNA_{FAK} exibiam redução significativa na expressão da FAK. Assim, os efeitos benéficos do silenciamento da FAK no remodelamento do VE hipertrófico foram paralelos a atenuação da fibrose intersticial, sugerindo uma função da FAK na fibrogênese miocárdica induzida por sobrecarga pressórica crônica.

Estudos anteriores mostraram que a expressão gênica e atividade gelatinolítica elevadas de MMP-2 no miocárdio de roedores submetido à sobrecarga pressórica é um evento uniforme do remodelamento do miocárdio (PETERSON et al., 2001; SPINALE, 2002; MATSUSAKA et al., 2006). Desta maneira, MMP-2 é considerada uma das moléculas principais determinantes do processo de remodelamento da matriz extracelular no miocárdio submetido à sobrecarga mecânica (IWANAGA et al., 2002; BERGMAN et al., 2007).

Neste estudo demonstramos que o estímulo mecânico é capaz de induzir o aumento da atividade gelatinolítica de MMP-2 no miocárdio de camundongos submetidos à 7 dias de coarctação da aorta. O silenciamento da FAK aboliu o aumento da atividade de MMP-2 no VE de camundongos, acompanhado pela atenuação no aumento do conteúdo de colágeno no miocárdio.

Como os fibroblastos são as principais células secretoras de MMPs no miocárdio em resposta ao estímulo mecânico, demonstramos que fibroblastos extraídos do VE de camundongos tratados com siRNA_{GFP} e submetidos à 7 dias de coarctação da aorta possuíam aumento na expressão da MMP-2. Porém, o silenciamento da FAK nos fibroblastos isolados de corações de camundongos submetidos à sobrecarga mecânica era acompanhado pela redução na expressão de MMP-2. Esta correlação sugere que o efeito

protetor da FAK no VE sob condições de sobrecarga pressórica crônica pode ser mediado via MMP-2.

Este dado está de acordo com observações anteriores que indicam que a FAK pode regular a expressão, secreção e ativação de MMP-2 (WU et al., 2005). Ainda, Matsusaka et al., 2006, mostraram a inibição da hipertrofia cardíaca e fibrose em camundongos *knockout* para MMP-2 quando submetidos à sobrecarga pressórica, em comparação com aos animais selvagens. Juntos, estes dados indicam que a sinalização da FAK pode ser um ponto de controle importante na coordenação do processo dinâmico de motilidade celular dos fibroblastos e remodelamento da matriz extracelular no VE hipertrófico.

4.2.3- Avaliação do tratamento com siRNA_{FAK} da hipertrofia cardíaca instalada induzida por sobrecarga pressórica crônica em camundongos

Outro achado principal deste estudo foi que reduções transientes da expressão de FAK pela estratégia de iRNA reverteu a hipertrofia do VE já estabelecida em camundongos mantidos sob condições de sobrecarga pressórica crônica. Isto implica que FAK é necessária não apenas para o desenvolvimento, mas também para sustentar a hipertrofia do VE em resposta à sobrecarga pressórica crônica.

Demonstramos que administração intravenosa de uma única dose de siRNA_{FAK}, via veia jugular, foi capaz de produzir uma redução prolongada na expressão da FAK (~60-44%, 21 dias) no VE hipertrófico de camundongos submetidos à sobrecarga pressórica crônica. A redução na expressão gênica da FAK foi paralela a regressão da hipertrofia cardíaca. Este processo foi novamente devido às respostas ao estímulo mecânico dos dois tipos celulares predominantes do coração: (1) cardiomiócitos, relacionados a redução do diâmetro médio e na expressão do marcador molecular de hipertrofia β -MHC, (2) fibroblastos, relacionados a regressão da fibrose miocárdica instalada.

Além regredir o crescimento hipertrófico, o silenciamento miocárdico da FAK também aboliu a consequente deterioração estrutural e funcional do VE hipertrófico. Ainda, mostramos que a disfunção do VE submetido à sobrecarga pressórica crônica era paralela

ao aumento da expressão e atividade da FAK no miocárdio. Assim, é razoável supor que a persistência da ativação da sinalização da FAK em resposta ao estímulo mecânico possa ser prejudicial ao VE hipertrófico.

É interessante notar que os animais tratados com siRNA_{FAK} apresentaram maior taxa de sobrevivência ao longo do período estudado, apesar da regressão da hipertrofia cardíaca e persistência da sobrecarga pressórica.

Evidências sugerem que o processo hipertrófico cardíaco em resposta a estímulos patológicos pode não ser inteiramente benéfico. Neste contexto, estudos demonstraram que a redução na massa cardíaca representa um marcador prognóstico favorável independente do tratamento utilizado (VERDECCHIA et al., 1998; MATHEW et al., 2001).

Além disso, sabe-se que o grau de fibrose nos corações hipertróficos contribui para a determinação do prognóstico em pacientes humanos. O grau de fibrose mais elevado está associado com o aumento na morbidade cardiovascular e mortalidade. De fato, o acúmulo de colágeno nos corações hipertróficos pode ser considerado uma etapa inicial para a insuficiência cardíaca, pois é responsável inicialmente pela diminuição da complacência das câmaras cardíacas e disfunção diastólica, progredindo para a disfunção sistólica deletéria (SELVETELLA et al., 2004). Assim, a diminuição do índice de massa do VE acompanhado pela regressão da fibrose cardíaca pode ser um fator determinante na melhora dos aspectos funcionais do processo hipertrófico e sobrevivência dos camundongos tratados com siRNA_{FAK}.

Em conclusão, estes resultados indicam que a sinalização mediada pela FAK é necessária não apenas para o desenvolvimento, mas também para sustentar a hipertrofia em resposta a sobrecarga pressórica crônica. Ainda, a persistência da ativação da FAK pode afetar de maneira prejudicial a estrutura e função do ventrículo esquerdo submetido a sobrecarga pressórica crônica. A demonstração de que o silenciamento da FAK pode prevenir a hipertrofia e a deterioração cardíaca realça o potencial do silenciamento da FAK por siRNA como uma estratégia terapêutica aplicável que pode amenizar o remodelamento maladaptativo e o prognóstico das doenças cardiovasculares que evoluem com hipertrofia e insuficiência cardíaca.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANCACCIO, M.; HIRSCH, E.; NOTTE, A.; SELVETELLA, G.; LEMBO, G.; TARONE, G.. “Integrin signalling: the tug-of-war in heart hypertrophy”. **Cardiovasc Res**, 70: 422-33, 2006.

BRIDGE, A.; PEBERNARD, S.; DUCRAUX, A.; NICOULAZ, A.; IGGO, R.. “Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells”. **Nat Genet**, 34:263–64, 2003.

BURRIDGE K.; CHRZANOWSKA-WODNICKA M. “Focal adhesions, contractility, and signaling”. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 12:463–519, 1996.

CALAB M. B.; POLTE T. R.; HANKS S. K. “Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases”. **Mol Cell Biol**, 15:954-63, 1995.

CANEL, M.; SECADES, P.; GARZÓN-ARANGO, M.; ALLONCA, E.; SUAREZ, C.; SERRELS, A.; FRAME, M.; BRUNTON, V.; CHIARA, M.. “Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinomas via regulation of MMP-2 expression”. **Br J Cancer**, 98(7): 1274-84, 2008.

CHANG Y.; CEACAREANU B.; DIXIT M.; SREEJAYAN N.; . HASSID A. “Nitric Oxide-Induced Motility in Aortic Smooth Muscle Cells: Role of Protein Tyrosine Phosphatase SHP-2 and GTP-Binding Protein Rho”. **Circ Res**, 91(5): 390-97, 2002.

CLARK K. A.; MCELHINNY A. S.; BECKERLE M. C.; GREGORIO C. C.. “Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function”. **Annu Rev Cell Dev Biol**, 18:637–706, 2002.

CONTRERAS, J.; VILATOBA, M.; ECKSTEIN, C.; BILBAO, G.; THOMPSON, A.; ECKHOFF, D.. “Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver mouse”. **Surgery**, 136(2): 390-400, 2004.

COOPER, G.. “Basic determinants of myocardial hypertrophy: a review of molecular mechanisms”. **Annu Rev Med**, 48:13-23, 1997.

DiMICHELE, L.; DOHERTY, J.; ROJAS, M.; BEGGS, H.; REICHARDT, L.; MACK, C.; TAYLOR, J.. “Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy”. **Circ Res**, 99: 636-45, 2996.

DIWAN, A.; DORN II, G.. “Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutics targets”. **Physiology**, 22: 56-64, 2007.

DOMINGOS, P.; FONSECA, P.; NADRUZ JR, W.; FRANCHINI, K.. “Load-induced focal adhesion kinase in the myocardium: role of stretch and contractile activity”. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282: H556-64, 2002.

DORN II, G.; ROBBINS, J.; SUGDEN, P.. “Phenotyping hypertrophy: Eschew obfuscation”. **Circ. Res.**, 92: 1171-75, 2003.

DORNII, G.. “The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy”. **Hypertension**, 49: 962-70, 2007.

DUXBURY, M.; ITO, H.; BENOIT, E.; ZINNER, M.; ASHLEY, S.; WHANG, E.. “RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemosensitivity”. **Biochem Biophys Res Commun**, 311: 786-92, 2003.

DYKXHOORN, D.; NOVINA, C.; SHARP, P.. “Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression”. **Mol Cell Biol**, 4: 457-67, 2003.

DYKXHOORN, D.; LIEBERMAN, J.. “The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool, and therapeutic”. **Annu Rev Med**, 56: 401-23, 2005.

DYKXHOORN, D.; LIEBERMAN, J.. “Knocking down disease with siRNAs”. **Cell**, 126:231–35, 2006.

EBLE, D.; STRAIT, J.; GOVINDARAJAN, G.; LOU, J.; BYRON, K.; SAMAREL, A.. “Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase”. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 278: H695-707, 2000.

ELBASHIR, S.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T.. “Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells”. **Nature**, 411: 494–98, 2001.

- EPSTEIN N. D.; DAVIS J. S. "Sensing stretch is fundamental". **Cell**, 112:147–50, 2003.
- FEDOROV, Y.; KING, A.; ANDERSON, E.; KARPILOW, J.; ILSLEY, D.; MARSHALL, W.; KHVOROVA, A.. "Different delivery methods-different expression profiles". **Nat Methods**, 2:241, 2005.
- FONSECA, P.; INOUE, R.; KOBARG, C.; CROSARA-ALBERTO, D.; KOBARG, J.; FRANCHINI, K.. "Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes". **Circ Res**, 96(1): 73-81, 2005.
- FRANCHINI, K.; TORSONI, A.; SOARES, P.; SAAD, M.. "Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in rat heart". **Circ Res**, 87: 558-65, 2000.
- HAGSTROM, J.; HEGGE, J.; ZHANG, G.; NOBLE, M.; BUDKER, D.; LEWIS, D.; HERWEIJER, H.; WOLFF, J.. "A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs". **Molec Ther**, 10(2): 386-98, 2004.
- HALDER, J.; KAMAT, A.; LANDEN, C; HAN, L; LUTGENDORF, S.; LIN, Y.; MERRITT, W.; JENNINGS, N.; CHAVEZ-REYES, A.; COLEMAN, R.; GERHENSIN, D.; SCHMANDT, R.; COLE, S.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A.. "Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy". **Clin Cancer Res**, 12(16): 4916-24, 2006.
- HANKS, S.; RYZHOVA, L.; SHIN, N.; BRABEK, J.. "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility". **Front Biosci**, 8: D982-96, 2003.
- HEIDEL, J.; HU, S.; LIU, X.; TRICHE, T.; DAVEIS, M.. "Lack of interferon response in animals to naked siRNAs". **Nat Biotechnol**, 22(12):1579-82, 2004.
- HEIN, S.; ARNON, E.; KOSTIN, S.; SCHÖNBURG, M.; ELSÄSSER, A.; POLYAKOVA, V.; BAUER, E.; KLÖVEKORN, W.; SCHAPER, J.. "Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms". **Circulation**, 107(7):984-91, 2003.

- HEINEKE, J.; MOLKENTIN, J.. “Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways”. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 7: 589-600, 2006.
- HILL, J.. “Electrical remodeling in cardiac hypertrophy”. **Trends Cardiovasc Med**, 13:316–22, 2003.
- HOSHIJIMA M.; CHIEN K. R. “Mixed signals in heart failure: cancer rules”. **J Clin Invest**, 109: 849-55, 2002.
- HORNUNG, V.; GUENTHNER-BILLER, M.; BOURQUIN, C.; ABLASSER, A.; SCHLEE, M.; UEMATSU, S.; NORONHA, A.; MANOHARAN, M.; AKIRA, S.; DE FOUGEROLLES, A.; ENDRES, S.; HARTMANN, G.. “Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7”. **Nat Med**, 11: 263–70, 2005.
- HUDLICKA, O.; BROWN, M.; EGGINTON, S.. “Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle”. **Physiol Rev**, 72: 369-417, 1992.
- IEMITSU, M.; MIYANCHI T.; MAEDA, S.; SAKAI, S.; KOBAYASHI, T.; FUJII, N.; MIYAZAKI, H.; MATSUDA, M.; YAMAGUCHI, I.. “Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in rat”. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 281: R2029-36, 2001.
- ILIĆ, D.; FURUTA, Y.; KANAZAWA, S.; TAKEDA, N.; SOBUE, K.; NAKATSUJI, N.; NOMURA, S.; FUJIMOTO, J.; OKADA, M.; YAMAMOTO, T.. “Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice”. **Nature**, 377(6549):539-44, 1995.
- IWAKI, K.; SUKHATME, V.; SHUBEITA, H.; CHIEN, K.. “Adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an α 1-mediated response”. **J Biol Chem**, 265:13809–17, 1990.
- IWANAGA, Y.; AOYAMA, T.; KIHARA, Y.; ONOZAWA, Y.; YONEDA, T.; SASAYAMA, S.. “Excessive activation of matrix metalloproteinase coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive hearts”. **J Am Coll Cardiol**, 39: 1384-91, 2002.

JACKSON, A.; BARTZ, S.; SCHELTER, J.; KOBAYASHI, S.; BURCHARD, J.; MAO, M.; LI, B.; CAVET, G.; LINSLEY, P.. “Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi”. **Nat Biotechnol**, 21: 635–37, 2003.

JANMEY P. A. “The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling”. **Physiol Rev**, 78: 763–81, 1998.

JUDGE, A.; SOOD, V.; SHAW, J.; FANG, D.; McCLINTOCK, K.; MacLACHLAN, I.. “Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA”. **Nat Biotechnol**, 23(4): 457-62, 2005.

KARIKO, K.; BHUYAN, P.; CAPODICI, J.; NI, H.; LUBINSKI, J.; FRIEDMAN, H.; WEISSMAN, D.. “Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3”. **Cells Tissues Organs**, 177: 132–38, 2004.

KATZ, A.. “Heart failure: a hemodynamic disorder complicated by maladaptative proliferative responses”. **J Cell Mol Med**, 7(1): 1-10, 2003.

KONG, S.; BODYAK, N.; YUE, P.; LIU, Z.; BROWN, J.; IZUMO, S.; KANG, P.. “Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats”. **Physiol Genomics**, 21: 34-42, 2005.

KHVOROVA A, REYNOLDS A, JAYASENA S. “Functional siRNAs and miRNAs exhibits strand bias”. **Cell**, 115: 209-16, 2003.

KOVACIC-MILIVOJEVIC, B.; ROEDIGER, F.; ALMEIDA, E.; DAMSKY, C.; DAMSKY, C.; GARDNER, D.; ILIC, D.. “Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy”. **Mol Biol Cell**, 12: 2290-307, 2001.

KRENZ, M.; ROBBINS, J.. “Impact of beta-myosin heavy chain expression on cardiac function during stress”. **J Am College Cardiol**, 44(12): 2390-2397, 2004.

LASER, M.; WILLEY, C.; JIANG, W.; COOPER IV, G.; MENICK, D.; ZILE, M.; KUPPUSWAMY, D.. “Integrin activation nad focal adhesion complex formation in cardiac hypertrophy”. **J Biol Chem**, 275(45): 35624-30, 2000.

LEONG, H.; BROWNSEY, R.; KULPA, J.; ALLARD, M.. “Glycolysis and pyruvate oxidation in cardiac hypertrophy-why so unbalanced?” **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**,135:499–513, 2003.

LEUNG, R.; WHITTAKER, P.. “RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics”. **Pharmacol & Therapeutics**, 107(2): 222-39, 2005.

LEVY D.; GARRISON R. J.; SAVAGE D. D.; KANNEL W. B.; CASTELLI W. P. “Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study”. **N Engl J Med**, 322:1561-66, 1990.

LEWIS, D.; HAGSTROM, J.; LOOMIS, A.; WOLFF, J.; HERWEIJER, H..”Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice”. **Nat Genet**, 32(1): 107-08, 2002.

LEWIS, D.; WOLFF, J.. “Systemic siRNA delivery via hydrodynamic intravascular injection”. **Adv Drug Deliv Rev**, 59: 115-23, 2007.

LI, Y.; McTIERNAN, C.; FELDMAN, A.. “Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling”. **Cardiovasc Res**, 46: 214-24, 2000.

LIETHA,D.; CAI, X.; CECCARELLI, D.; LI, Y.; SCHALLER, M.; ECK, M.. “Structural Basis for the Autoinhibition of Focal Adhesion Kinase”. *Cell*, 129: 1177–87, 2007.

LIM, S.; CHEN, X.; LIM, Y.; HANSON, D.; VO, T.; HOWERTON, K.; LAROCQUE, N.; FISHER, N.; SCHLAEPFER, D.; ILIC, D..“Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation”. **Mol Cell**, 29(1): 9–22, 2008.

LIU, F.; SONG, Y.; LIU, D.. “Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA”. **Gene Ther**, 6: 1258-66, 1999.

LOPES, M.; RIBEIRO, G.; TORNATORE, T.; CLEMENTE, C.; TEIXEIRA, V.; FRANCHINI, F.. “Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overload human heart”. **Clin Sci**, 113(4):195-204, 2007.

MATHEW, J.; SLEIGHT, P.; LONN, E.; JOHNSTONE, D.; POGUE, J.; YI, Q.; BOSCH, J.; SUSSEX, B.; PROBSTFIELD, J.; YUSUF, S.. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Investigators. “Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril”. **Circulation**, 104:1615 –21, 2001.

MATSUSAKA, H.; IDE, T.; MATSUSHIMA, S.; IKEUCHI, M.; KUBOTA, T.; SUNAGAWA, K.; KINUGAWA, S.; TSUTSUI, H.. “Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload”. **Hypertension**, 47: 711-17, 2006.

McCAFFREY, A.; MEUSE, T.; PHAM, D.; CONKLIN, D.; HANNON, G.; KAY, M.. “RNA interference in adult mice”. **Nature**, 418: 38-9, 2002.

McCAFFREY, A.; NAKAI, H.; PANDEY, K.; HUANG, Z.; SALAZAR, F.; XU, H.; WIELAND, S.; MARION, P.; KAY, M.. “Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference”. **Nature Biotech**, 21(6): 639-44, 2003.

MEERSON, F.. “On the mechanism of compensatory hyperfunction and insufficiency of the heart”. **Cor Vasa**, 3: 161-77, 1961.

MIROTSOU, M.; DZAU, V.; PRATT, R.; WEINBERG, E.. “Physiological genomics of cardiac disease: quantitative relationships between gene expression and left ventricle hypertrophy”. **Physiol Genomics**, 27: 86-94, 2006.

MITRA, S.; HANSON, D.; SCHLAEPFER, D.. “Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility”. **Nature Rev**, 6: 56-68, 2005.

MODLINGER, P.; CHABRASHVILI, T.; GILL, P.; MENDONCA, M.; HARRISON, D.; GRIENDLING, K.; LI, M.; RAGGIO, J.; WELLSTEIN, A.; CHEN, Y.; WELCH, W.; WILCOX, C.. “RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin slowpressor response”. **Hypertension**, 47:238-44, 2006.

MOLKENTIN, J.; LU, J.; ANTOS, C.; MARKHAM, B.; RICHARDSON, J.; ROBBINS, J.. “A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy”. **Cell**, 93: 215-28, 1998.

- NADRUZ JR., W.; CORAT, M.; MARIN, T.; GUIMARAES PEREIRA, G.; FRANCHINI, K.. “Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program”. **Cardiovasc Res**, 68:87–97, 2005.
- PALLISER, D.; CHOWDHURY, D.; WANG, Q.; LEE, S.; BRONSON, R.; KNIPE, D.; LIEBERMAN, J.. “An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection”. **Nature**, 439: 89-94, 2006.
- PANEK, A.; BADER, M.. “matrix reloaded: the matrix metalloproteinase paradox”. **Hypertension**, 47: 640-41, 2006.
- PARSONS J. T. “Focal adhesion kinase: the first ten years”. **J Cell Sci**, 116: 1409-16, 2003.
- PEDERSON, T.. “RNA interference and RNAi silencing: How far will they reach?”. **Mol Biol Cell**, 15(2): 407-10, 2004.
- PENG, X.; KRAUS, M.; WEI, H.; SHEN, T.; PARIAT, R.; ALCARAZ, A.; JI, G.; CHENG, L.; YANG, Q.; KOTLIKOFF, M.; CHEN, J.; CHIEN, K.; GU, H.; GUAN, J.. “Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice”. **J Clin Invest**, 116(1): 217-27, 2006.
- PERSENGIEV, S.; ZHU, X.; GREEN, M.. “Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)”. **RNA**, 10: 12–18, 2004.
- PHAM, C.; HARPF, A.; KELLER, R.; VU, H.; SHAI, A.; LOFTUS, J.; ROSS, R.. “Striated muscle-specific β 1D-integrin and FAK are involved in cardiac myocyte hypertrophic response pathway”. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 279: H2916-26, 2000.
- RODRÍGUES-FERNÁNDEZ, J. L.. “Why do so many stimuli induce tyrosine phosphorylation of FAK?”. **Bioessays**, 21: 1069-75, 1999.
- ROSS, R.; PHAM, C.; SHAI, S.; GOLDBERGER, J.; FENCZIK, C.; GLEMBOTSKI, C.; GINSBERG, M.; LOFTUS, J.. “ β 1 integrin participates in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes”. **Circ Res**, 82: 1160-72, 1998.

ROTH, D.; SWANEY, J.; DALTON, N.; GILPIN, E.; ROSS JR, J.. “Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice”. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 282: H2134-40, 2002.

SADOSHIMA J.; IZUMO S. “The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress”. **Annu Rev Physiol**, 59:551-571, 1997. SCHALLER, M. D.; PARSONS, J. T.. “Focal adhesion kinase: an integrin-linked protein tyrosine kinase”. **Trends Cell Biol**, 3: 258-62, 1993.

SADOSHIMA J, IZUMO S. “The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress”. **Annu Rev Physiol**, 59:551-571, 1997.

SAXENA, S.; JONSSON, Z.; DUTTA, A.. “Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells”. **J Biol Chem**, 278: 44312–19, 2003.

SCHAPER J.; FROEDE R.; HEIN S.; BUCK A.; HASHIZUME H.; SPEISER B.; FRIEDL A. AND BLEESE N. “Impairment of the myocardial ultrastructure and changes of the cytoskeleton in dilated cardiomyopathy”. **Circulation**, 83: 504–14, 1991.

SCHAUB M. C.; HEFTI M. A.; HARDER B. A.; EPPENBERGER, H. M. ”Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes”. **J Mol Med**, 75:901-920, 1997.

SCHEUER, J.; MALHOTRA, A.; HIRSCH, C.; CAPASSO, J.; SCHAIBLE, T.. “Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats”. **J Clin Invest.**, 70:1300–1305, 1982.

SCOPACASA B. S.; TEIXEIRA V. P.; FRANCHINI K. G. “Colchicine attenuates left ventricular hypertrophy but preserves cardiac function of aortic-constricted rats”. **J Appl Physiol**, 94:1627-33, 2003.

SELVETELLA, G.; HIRSCH, E.; NOTTE, A.; TARONE, G.; LEMBO, G.. “Adaptive and maladaptive hypertrophy pathways: points of convergence and divergence”. **Card. Res.**, 63: 573-80, 2004.

SELVETELLA, G.; LEMBO, G.. “Mechanisms of cardiac hypertrophy”. **Heart Failure Clin**, 1: 263-73, 2005.

SHAI, S-Y.; HARPF, A.; BABBIT, C.; JORDAN, N.; FISHBEIN, M.; CHEN, J.; OMURA, M.; LEIL, T.; BECKER, K.; JIANG, M.; SMITH, D.; CHERRY, S.; LOFTUS, J.; ROSS, R.. “Cardiac myocyte-specific excision of the $\beta 1$ integrin gene results in myocardial fibrosis and cardiac failure”. **Circ Res**, 90: 458-64, 2002.

SHIMOMURA, H.; TERASAKI, F.; HAYASHI, T.; KITaura, Y.; ISOMURA, T.; SUMA, H.. “Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy”. **Jpn Circ J**, 65(11):965-8, 2001.

SHIOJIMA, I.; SATO, K.; IZUMIYA, Y.; SCHIEKOFER, S.; ITO, M.; LIAO, R.; COLUCCI, W.; WALSH, K.. “Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure”. **J Clin Invest**, 115: 2108–18, 2005

SIESSER, P.; HANKS, S.. “The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer”. **Clin Cancer Res**, 12(11): 3233-37, 2006.

SONG, E.; LEE, S.; WANG, J.; INCE, N.; OUYANG, N.; MIN, J.; CHEN, J.; SHANKAR, P.; LIEBERMEN, J.. “RNA interference targeting Fas protecting mice from fulminant hepatitis”. **Nat Med**, 9: 347-51, 2003A.

SONG, E.; LEE, S.; DYKXHOORN, D.; NOVINA, C.; ZHANG, D.; CRAWFORD, K.; CERNY, J.; SHARP, P.; LIEBERMAN, J.; MANJUNATH, N.; SHANKAR, P.. “Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages”. **J. Virol.**, 77: 7174-81, 2003B.

SORENSEN, D.; LEIRDAL, M.; SIOUD, M.. “Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice”. **J Mol Biol**, 327:761–66, 2003.

SOUTSCHEK, J.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; CHARISSE, K.; CONSTIEN, R.; DONOGHUE, M.; ELBASHIR, S.; GEICK, A.; HADWIGER, P.; HARBORTH, J.; JOHN, M.; KESAVAN, V.; LAVINE, G.; PANDEY, R.; RACIE, T.; RAJEEV, K.; RÖHL, I.; TOUDJARSKA, I.; WANG, G.; WUSCHKO, S.; BUMCROT, D.; KOTELIANSKY, V.; LIMMER, S.; MANOHARAN, M.; VORNLOCHER, H.. “Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs”. **Nature**, 432: 173–78, 2004.

SPINALE, F.. “Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart”. **Circ Res**, 90: 520-30, 2002.

ST. JOHN SUTTON M.; PFEFFER M. A; PLAPPERT T. et al. for the SAVE Investigators. “Quantitative two-dimensional echocardiographic measurements are major predictors of adverse cardiovascular events after acute myocardial infarction”. **Circulation**, 89: 68–75, 1994.

SUSSMAN, M.; McCULLOCH, A.; BORG, T.. “Dance band on the *Titanic*: biochemical signaling in cardiac hypertrophy”. **Circ Res**, 91: 888-98, 2002.

TAYLOR, E.; ANDERSON, D.; PATWELL, J.; PLAUT, K.; McCULLOGH, E.. Dorland’s illustrated medical dictionary. 27th ed. Philadelphia, Pa: WB saunders Co, 1988.

TAYLOR, J.; ROVIN, J.; PARSONS, J.. “A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes”. **J Biol Chem**, 275: 19250-57, 2000.

THAMILSELVAN, V.; CRAIG, D.; BASSON, M.. “FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway”. **FASEB J**, 21(8): 1730-41, 2007.

TOMANEK, R.. “Quantitative ultrastructural aspects of cardiac hypertrophy”. **Tex Rep Biol Med**, 39:111–122, 1979.

TOMPKINS, S.; LO, C.; TUMPEY, T.; EPSTEIN, S.. “Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*”. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101(23):8682-86, 2004.

TORSONI A. S.; FONSECA P. M.; CROSARA-ALBERTO D. P.; FRANCHINI K. G. “Early activation of p160ROCK by pressure overload in rat heart”. **Am J Physiol Cell Physiol**, 284:C1411-19, 2003.

TORSONI, A.; CONSTANCIO, S.; NADRUIZ JR, W.; HANKS, S.; FRANCHINI, K.. “Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes”. **Circ Res**, 93: 140-47, 2003.

TUSCHL, T.; BORKHARDT, A.. “Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy”. **Mol Interventions**, 2(3): 158-67, 2002.

VADALI, K.; CAI, X.; SCHALLER, D.. “Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions”. **IUBMB Life**, 59(11): 709-16, 2007.

VATNER, S.. “Reduced subendocardial myocardial perfusion as one mechanism for congestive heart failure”. **Am J Cardiol**, 62: 94E-98E, 1988.

VERDECCHIA, P.; SCHILLACI, G.; BORGIONI, C.; CIUCCI, A.; GATTOBIGLIO, R.; ZAMPI, I.; REBOLDI, G.; PORCELLATI, C.. “Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension”. **Circulation**, 97:48 –54, 1998.

WEBER, K.; BRILLA, C.. “Myocardial fibrosis and the renin-angiotensin-aldosterone system”. **J Cardiovasc Pharmacol**, 20 (Suppl 1): S48-54, 1992.

WEBER, K.. “Fibrosis and hypertensive heart disease”. **Curr Opin Cardiol**, 15: 264-72, 2000.

WINER, J.; JUNG, C.; SHACKEL, I.; WILLIAMS, M. “Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes *in vitro*”. **Anal. Biochem.**, 270: 41-49, 1999.

WU, X.; GAN, B.; YOO, Y.; GUAN, J.. “FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation”. **Dev. Cell.**, 9: 185-96, 2005.

YUSSMAN, M.; TOYOKAWA, T.; ODLEY, A.; LYNCH, R.; WU, G.; COLBERT, M.; ARONOW, B.; LORENZ, J.; DORN, G.. “Mitochondrial death pathway protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy”. **Nat Med**, 8: 725-30, 2002.

ZENDER, L.; HUTKER, S.; LIEDTKE, C.; TILLMANN, H.; ZENDER, S.; MUNDT, B.; WALTEMATHE, M.; GOSLING, T.; FLEMMING, P.; MALEK, N.; TRAUTWEIN, C.; MANNS, M.; KUHNEL, F.; KUBICKA, S.. “Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice”. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100(13): 7797-802, 2003.

ZIMMERMANN, T.; LEE, A.; AKINC, A.; BRAMLAGE, B.; BUMCROT, D.; FEDORUK, M.; HARBORTH, J.; HEYES, J.; JEFFS, L.; JOHN, M.; JUDGE, A.; LAM, K.; McCLINTOCK, K.; NECHEV, L.; PLAMER, L.; RACIE, T.; ROHL, I.; SEIFFERT, S.; SHANMUGAM, S.; SOOD, V.; SOUTSCHEK, J.; TOUDJARSKA, I.; WHEAT, A.; YAWORSKI, E.; ZEDALIS, W.; KOTELIANSKY, V.; MANOHARAN, M.; VORNLOCHER, H.; MacLACHLAN, I.. “RNAi-mediated gene silencing in non-human primates”. **Nature**, 441: 111-14, 2006.

ZHANG, G.; BUDKER, V.; WOLFF, J.. “High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA”. **Human Gene Ther**, 10: 1735-37, 1999.

ZHANG, G.; BUDKER, V.; WILLIAMS, P.; HANSON, J.; WOLFF, J.. “Surgical procedures for intravascular delivery of plasmid DNA to organs”. **Methods Enzymol**, 346: 125-33, 2002.

6- ANEXO

Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice

Carolina F.M.Z. Clemente, Thais F. Tomatore, Thais H. Theizen, Ana C. Deckmann, Tiago C. Pereira, Iscia Lopes-Cendes, José Roberto M. Souza and Kleber G. Franchini

Circ. Res. 2007;101;1339-1348; originally published online Oct 18, 2007;
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160978

Circulation Research is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214

Copyright © 2007 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0009-7330. Online ISSN: 1524-4571

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://circres.ahajournals.org/cgi/content/full/101/12/1339>

Subscriptions: Information about subscribing to Circulation Research is online at
<http://circres.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax: 410-528-8550. E-mail: journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Downloaded from circres.ahajournals.org by KLEBER FRANCHINI on January 14, 2008

Targeting Focal Adhesion Kinase With Small Interfering RNA Prevents and Reverses Load-Induced Cardiac Hypertrophy in Mice

Carolina F.M.Z. Clemente, Thais F. Tornatore, Thais H. Theizen, Ana C. Deckmann, Tiago C. Pereira, Iscia Lopes-Cendes, José Roberto M. Souza, Kleber G. Franchini

Abstract—Hypertrophy is a critical event in the onset of failure in chronically overloaded hearts. Focal adhesion kinase (FAK) has attracted particular attention as a mediator of hypertrophy induced by increased load. Here, we demonstrate increased expression and phosphorylation of FAK in the hypertrophic left ventricles (LVs) of aortic-banded mice. We used an RNA interference strategy to examine whether FAK signaling plays a role in the pathophysiology of load-induced LV hypertrophy and failure. Intrajugular delivery of specific small interfering RNA induced prolonged FAK silencing ($\approx 70\%$) in both normal and hypertrophic LVs. Myocardial FAK silencing was accompanied by prevention, as well as reversal, of load-induced left ventricular hypertrophy. The function of LVs was preserved and the survival rate was higher in banded mice treated with small interfering RNA targeted to FAK, despite the persistent pressure overload. Studies in cardiac myocytes and fibroblasts harvested from LVs confirmed the ability of the systemically administered specific small interfering RNA to silence FAK in both cell types. Further analysis indicated attenuation of cardiac myocyte hypertrophic growth and of the rise in the expression of β -myosin heavy chain in overloaded LVs. Moreover, FAK silencing was demonstrated to attenuate the rise in the fibrosis, collagen content, and activity of matrix metalloproteinase-2 in overloaded LVs, as well as the rise of matrix metalloproteinase-2 protein expression in fibroblasts harvested from overloaded LVs. This study provides novel evidence that FAK may be involved in multiple aspects of the pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure induced by pressure overload. (*Circ Res*. 2007;101:1339-1348.)

Key Words: cardiac myocytes ■ signaling ■ mechanical stress ■ heart failure

Left ventricular hypertrophy is a common feature of preclinical cardiovascular diseases with prognostic implications. Although the hypertrophy initially assumes a key role in the cardiac compensation for hemodynamic overload, it often evolves with structural and functional abnormalities that predispose to chamber maladaptive remodeling, heart failure and premature death.^{1,2} Early hypertrophic growth reflects the increased mass of cardiac myocytes, whereas maladaptive remodeling is additionally accompanied by abnormalities such as disproportionate growth of the myocardial interstitium, intrinsic dysfunction, and death of the myocytes that are postulated to be the underlying causes of the hypertrophy decompensation.³ Mechanical stress elicited by changes in hemodynamic forces and overactivity of neurohormonal factors have been considered the main triggering stimuli for the installation of hypertrophy as well as of the structural and functional deterioration occurring during hypertrophy decompensation.^{4,5}

Focal adhesion kinase (FAK) has received attention as a potential mediator of the cardiac myocyte responses to hypertrophic stimuli. Accordingly, FAK has been demonstrated to mediate the expression of hypertrophic genetic program in isolated cardiac myocytes in response to mechanical stress^{6–8} or to agonists such as endothelin and phenylephrine.^{9–11} Moreover, FAK expression has been shown to be persistently increased in hypertrophic rat and human left ventricle (LVs).^{12,13} Recently, myocyte-restricted FAK conditional knockout mice were generated by 2 independent groups that confirmed the critical importance of FAK for the load-induced hypertrophy of the LV.^{14,15} However, these authors reported contrasting phenotypic changes of the LV in response to pressure overload. Peng et al¹⁴ reported an eccentric hypertrophy and an increased length of cardiac myocytes, whereas DiMichele et al¹⁵ reported an attenuation of hypertrophy in response to pressure overload. These conflicting data and the limitations imposed by restricting the

Original received February 27, 2007; resubmission received July 30, 2007; revised resubmission received September 20, 2007; accepted October 4, 2007.

From the Departments of Internal Medicine (C.F.M.Z.C., T.F.T., T.H.T., A.C.D., J.R.M.S., K.G.F.) and Medical Genetics (T.C.P., I.L.-C.), School of Medicine, State University of Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Correspondence to Kleber G. Franchini, MD, PhD, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas Cidade Universitária “Zeferino Vaz” 13083-970 Campinas, Sao Paulo, Brazil. E-mail franchini@unicamp.br

© 2007 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.160978

Downloaded from circres.ahajournals.org by JOSE EBER FRANCHINI on January 14, 2008

FAK deletion to cardiac myocytes preclude a better understanding of the role of FAK in the complex pathophysiology of cardiac hypertrophy and its progress to failure.

In the present study, we report the development of a strategy to deplete FAK in mouse LVs by *in vivo* small interfering (si)RNA delivery and to address the influence of FAK in the pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure induced by chronic pressure overload in mice. We found that myocardial FAK silencing prevented and reversed left ventricular hypertrophy, myocardial fibrosis, and the deterioration of cardiac structure and function in chronically overloaded LVs.

Materials and Methods

An expanded Materials and Methods section is available in the online data supplement at <http://circres.ahajournals.org>.

Mice

Swiss mice (6 to 8 weeks old) were handled in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the Animal Care and Use Committee of the State University of Campinas. Procedures such as jugular and tail vein and carotid and femoral artery catheterization, aortic banding, and echocardiographic examination were performed under anesthesia with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Chronic pressure overload was obtained by transverse aortic constriction. Blood pressure was simultaneously recorded in the carotid and femoral arteries to determine the transconstriction systolic gradient.

Echocardiography

Two-dimensional M-mode echocardiography was performed with a 12-MHz probe connected to a Toshiba Power Vision system by a blinded observer at 15 minutes after the induction of anesthesia.

siRNA Synthesis

siRNA targeted to the mouse FAK gene was designed by a software that used internal stability parameters, as previously reported.¹⁶ DNA oligonucleotides (Integrated DNA Technologies) were as follows: (1) T7, 5'-GGTAAT ACGACTCACTATAG-3'; (2) FAK sense (AB030035), 5'-GCGAAATCCATAGCAGGCCACTA TAGTG-AGTCGTATTACC-3'; (3) FAK antisense, 5'-ACGTGGCCTGCT-ATGGATTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'; (4) GFP sense, 5'-GTGCTTGTAGTCCCGTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'; (5) GFP antisense, 5'-ATGACGGGAACACAAACACC-TATAGTGAGTCGTATTACC-3'.

Isolation of Adult Mouse Ventricular Myocytes and Fibroblasts

Ventricular myocytes and fibroblasts were isolated from mice 1 day after treatment with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} using a collagenase digestion method, as reported previously.¹⁷

Western Blotting

Tissue extracts containing equal amounts of total protein (50 μ g) were resolved by 8% SDS-PAGE. The membranes were incubated with primary antibodies and ¹²⁵I-protein A was used for the detection of specific bands.

Northern Blotting

Samples of total RNA (15 μ g) were resolved in denaturing gel and blotted with ³²P-labeled oligonucleotide FAK probes (151 bp) generated using the following primers: FAK sense (AB030035), 5'-ATGTTCTGGTGTCTCAATG-3' (gene coordinates 1590 to 1610); and FAK antisense, 5'-GAGGTAAAACGTCGAAAA-TTG-3' (gene coordinates 1720 to 1740).

Zymography

Samples of mouse LVs were resolved in SDS-PAGE containing 0.1% of gelatin. The gels were incubated for 24 hours in a matrix metalloproteinase (MMP) substrate buffer and then stained with a Coomassie blue solution. The MMP proteolytic activity was determined by image analysis of the zymograms.

LV Hydroxyproline

Samples of left ventricular posterior wall were used for quantitative estimation of myocardial hydroxyproline.

Interferon- γ Assay

Plasma interferon- γ concentration was obtained with an endogen mouse interferon- γ ELISA MiniKit according to the instructions of the manufacturer (Pierce).

Histological Examination

Sections of LVs were stained with Masson's trichrome to measure the cardiac myocyte diameter and the interstitium in heart sections.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed as described previously.⁷

RT-PCR Analysis

One-step RT-PCR was performed to assess the expression of β -myosin heavy chain (MHC) (sense, 5'-GCCAACACCAACCTG-TCCAAGGTTC-3'; and antisense, 5'-TGAAAAGGC TCCAGG-TCTGAGGGC-3') and GAPDH (sense, 5'-GGCATTGCTCTC-AATGACAA-3'; antisense, 5'-AGGGTGCAGHGGAACTTTAT-T3') was used as the reaction control.

Statistical Analysis

Data are presented as means \pm SEM. Differences between the mean values of the hemodynamic and echocardiographic data and densitometric readings were tested by 1-way or 2-way repeated-measures ANOVA. Post hoc analysis was performed with Bonferroni multiple-range test. Survival of siRNA_{FAK} versus siRNA_{GFP} banded mice were compared using the Kaplan-Mayer test. A value of $P < 0.05$ indicated statistical significance.

Results

FAK Expression and Phosphorylation Are Increased in Hypertrophic LVs

To examine FAK protein expression and phosphorylation at Tyr397 in the hypertrophic LVs, we studied different subgroups of mice that underwent sham operation (SO) or aortic banding (1 to 12 weeks). As shown in Figure 1A, left ventricular posterior wall thickness was already increased in 1-week banded mice, demonstrating the rapid hypertrophic growth typical of this model. Dilatation and reduction of fractional shortening of the LVs were also observed in this subgroup, likely because of the impact of the sudden aortic constriction. Increased LV wall thickness without dilatation or reduction in fractional shortening, were seen in mice studied 2, 3, or 6 weeks after aortic banding, indicating a compensated hypertrophy. However, 12-week banded mice showed chamber dilatation and reduction in fractional shortening, in addition to hypertrophy, indicating a stage of LV decompensation. Detailed hemodynamic, echocardiographic, and morphometric data of these subgroups are shown in supplemental Table I. Postmortem analysis confirmed the increases of left ventricular mass in banded mice. As expected, the average diameter of cardiac myocytes and the area

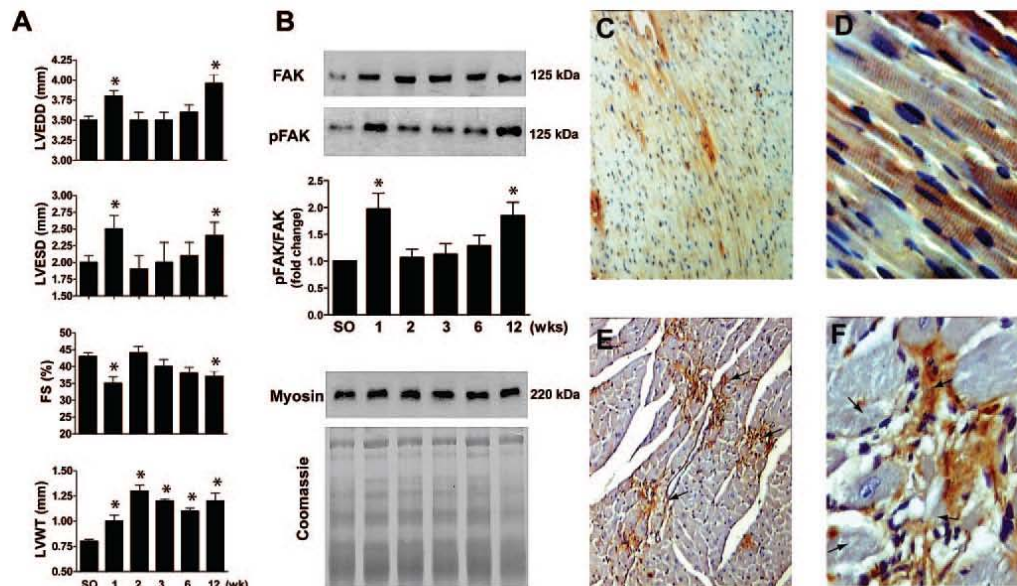


Figure 1. Pressure overload increases myocardial FAK expression and phosphorylation. **A**, Bar graph indicating the values of end diastolic diameter (LVEDD), end systolic diameter (LVESD), fractional shortening (FS), and posterior wall thickness (LVWT) of LVs from SO and aortic-banded mice (1 to 12 weeks after banding). **B**, Myocardial expression of FAK, pFAK, and myosin. The bar graph shows the average changes in the ratio between the densitometric values of myocardial pFAK and FAK expression. Coomassie-stained gel was used as a loading control. **C**, Low magnification ($\times 400$) of anti-FAK myocardial immunostaining from SO mice. **D**, High magnification ($\times 1200$) of anti-FAK myocardial staining from SO mice. **E**, Low magnification ($\times 400$) of anti-FAK myocardial staining from 12-week banded mice. **F**, High magnification ($\times 1200$) of anti-FAK myocardial staining from 12-week banded mice highlighting an area of myocardial focal fibrosis. * $P < 0.05$ compared with values of SO mice.

occupied by the myocardial interstitium were increased in banded mice (supplemental Table I).

Greater amounts of FAK were seen in the LVs of banded in comparison with SO mice (~ 2.0 -fold in 1- to 12-week banded mice) (Figure 1B). Phosphorylated FAK was also increased in samples of banded mice, peaking at the first and at the 12th week (~ 3.5 -fold) after aortic banding, so that the ratio of phosphorylated to total FAK (pFAK/FAK) (Figure 1B) was increased by 2.0- and 1.8-fold, respectively. Notably, the peaks in the pFAK/FAK ratio coincided with dilatation and reduced fractional shortening of the LVs. Samples were normalized to the densitometric values of cardiac myosin (Figure 1B). Coomassie staining of total LV protein resolved in SDS-PAGE, confirmed the loading of equal amounts of total myocardial protein in the gels (Figure 1B).

Immunostaining with anti-FAK antibody indicated that in the LVs of SO mice, FAK was mostly located in the cardiac myocytes (Figure 1C and 1D), with only a faint staining of the interstitial areas. However, in samples from banded mice, anti-FAK staining was detected in cardiac myocytes and in the areas of focal and perivascular interstitial fibrosis (Figure 1E and 1F).

Optimization of Myocardial FAK Silencing by siRNA

Next, we searched for an amount of siRNA_{FAK} that, when injected systemically via the jugular vein, could reduce the

myocardial FAK protein expression by at least 70% compared with the values normally seen in the mouse LVs. We started with 5 μg ($\sim 150 \mu\text{g/kg}$) of siRNA based on previous reports in the literature^{18,19} and demonstrated that 72% silencing of myocardial FAK could be obtained 24 hours after bolus injections of 15 μg ($\sim 500 \mu\text{g/kg}$) of siRNA_{FAK} diluted in 300 μL of PBS via the jugular vein (Figure 2A). We also examined whether high-pressure hydrodynamic injections of siRNA_{FAK} via the tail vein were effective in inducing FAK silencing in the mouse LVs. The representative example of Figure 2B indicates that injections of 15 μg of siRNA_{FAK}, diluted in 3 mL PBS, did not affect FAK expression in the LVs, likely because of the dilution of the siRNA.

The next aim of this study was to investigate the time course of myocardial FAK silencing after single injections of siRNA_{FAK} that were delivered systemically. As summarized in Figure 2C, myocardial FAK protein expression was reduced to $\sim 28\%$ at 1 and to $\sim 50\%$ at 7 and 15 days after the administration of siRNA_{FAK} in the LVs of normal mice. By the third week after siRNA_{FAK} injection, the amount of myocardial FAK reached levels comparable to those seen in mice treated with siRNA_{opp}. The analysis of Northern blots confirmed a similar reduction in FAK mRNA over time after siRNA_{FAK} injection (Figure 2D).

Additional experiments were performed to investigate whether myocardial FAK gene silencing included the cardiac

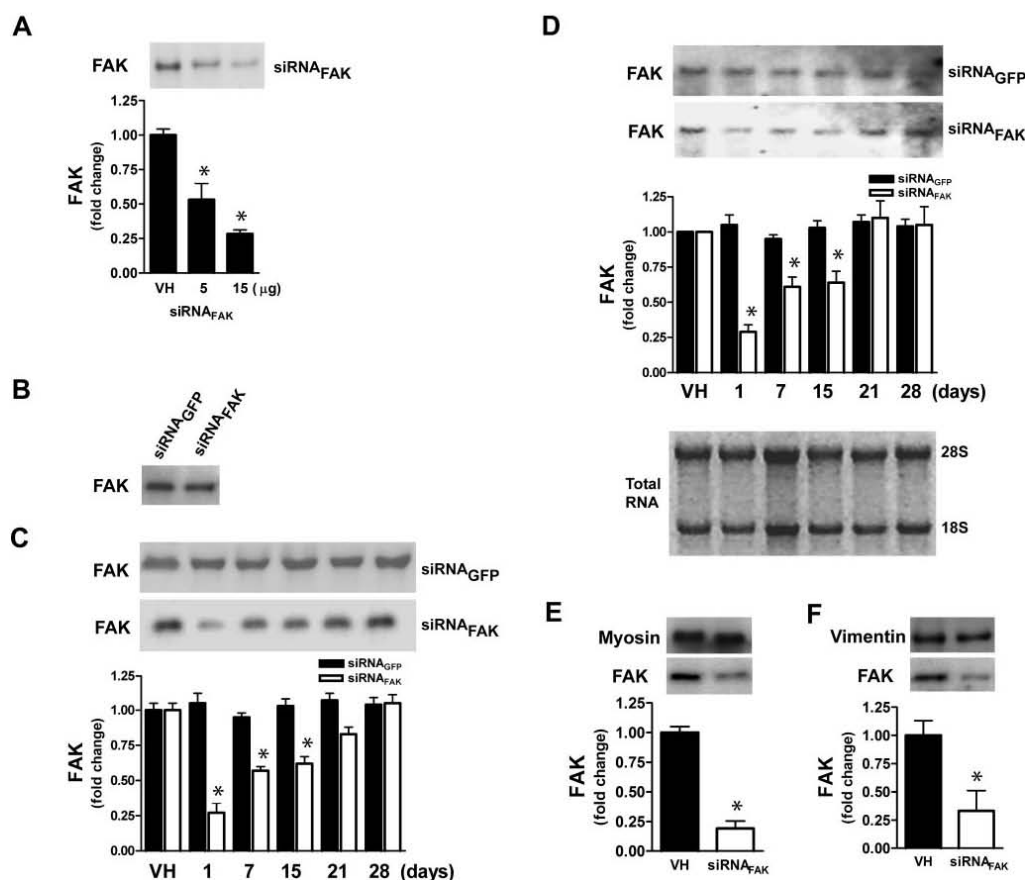


Figure 2. Myocardial FAK silencing by siRNA_{FAK}. **A**, FAK expression in the LVs of mice treated with increasing amounts of siRNA_{FAK} or vehicle (VH) via the jugular vein. **B**, Representative example (n=4) of FAK expression in the LVs of mice 24 hours after hydrodynamic injections of siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} (15 μg/3 mL) by tail vein. **C**, Time course of FAK protein expression normalized by myocardial myosin in the LVs of mice treated with a single dose of siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} (15 μg). **D**, Representative example and average values of FAK mRNA determined by Northern blotting of total RNA from LVs of mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} (15 μg). Total RNA 28S and 18S bands are shown as loading controls. **E**, FAK expression in isolated cardiac myocytes harvested from normal mouse LVs 24 hours after treatment with siRNA. The bar graph shows the average values of FAK normalized by the amount of myosin in the samples (N=4). **F**, FAK expression in fibroblasts harvested from mice 24 hours after siRNA (15 μg) treatment. The bar graph shows the average values of FAK in the samples (N=4). *P<0.05 compared with values of 50 mice.

myocytes and the fibroblasts. As shown in Figure 2E and 2F, FAK protein expression was reduced in the extracts from myocytes or fibroblasts harvested from the LVs 24 hours after the treatment with siRNA_{FAK} to an extent comparable to that of myocardial extracts.

Next, we aimed to investigate potential off-target and nonspecific effects related to siRNA_{FAK}. As shown in Figure 3A and 3B, no changes were seen in the myocardial expression of FAK-related protein tyrosine kinase, proline-rich tyrosine kinase 2 (Figure 3A), extracellular signal-regulated kinase 1/2, or cardiac myosin (Figure 3B) 24 hours after the injections of siRNA_{FAK} in normal mouse LVs. Another potential problem with RNA interference in mammalian

systems is the induction of the interferon response, which causes global, nonspecific inhibition of protein translation and might influence the effects of siRNA_{FAK} in the myocardium. As shown in Figure 3C, there was no significant change in the plasma levels of interferon-γ in a period ranging from 1 to 28 days after the injections of siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} in normal mice.

Finally, because the siRNA was injected systemically, we also analyzed FAK protein expression in tissues such as lung, kidney, and liver. Reductions in FAK expression similar to those seen in myocardial samples were observed in the lung and in the kidney; however, no change was detected in the liver after injections of siRNA_{FAK} (Figure 3D). The difference

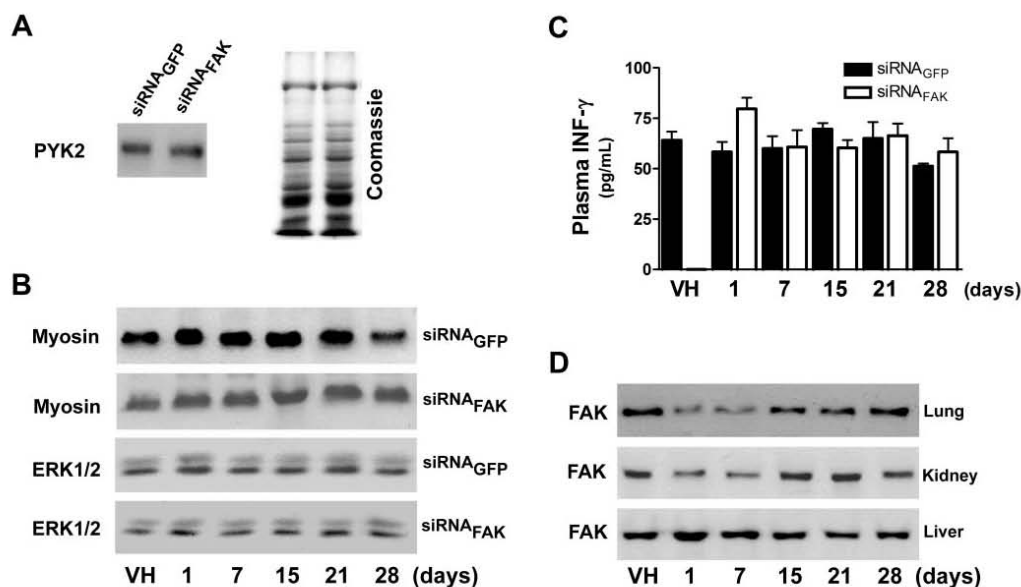


Figure 3. Search for off-target and nonspecific effects of siRNA_{FAK}. Mice treated for 1 up to 28 days with vehicle (VH), siRNA_{FAK}, or siRNA_{GFP} (15 μ g) via jugular vein. **A**, Representative example (N=4) of myocardial proline-rich tyrosine kinase 2 (PYK2) expression and Coomassie-stained gel. **B**, Myocardial expression of myosin and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 (N=6). **C**, Bar graph showing the average change of interferon (INF)- γ levels in plasma determined by ELISA (N=9). **D**, FAK expression in lung, kidney, and liver (N=4).

in the efficiency of FAK silencing in the liver and kidney might be related to differences in the arterial blood flow and mass between these organs.

FAK Silencing Retards Load-Induced Hypertrophy in Aortic-Banded Mice

To investigate whether myocardial FAK silencing affects the load-induced LV hypertrophy, siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} were injected on the day before sham operation or aortic banding (1 to 12 weeks). The data shown in Figure 4A indicate that single injections of siRNA_{FAK} significantly reduced FAK protein expression in the LVs of aortic-banded mice. This effect was still observed, although attenuated, in the group of mice studied 2 weeks after the siRNA injection. In contrast, in banded mice injected with siRNA_{GFP}, FAK protein expression was found to be increased at the first week after aortic banding and then thereafter. Next, experiments were performed to examine whether FAK silencing was also reflected in FAK mRNA levels. As shown in Figure 4B, aortic banding lasting for 7 days increased FAK mRNA expression by 2.4-fold in mice treated with siRNA_{GFP}, whereas in mice treated with siRNA_{FAK}, it was found to be reduced by \sim 40%. Moreover, as shown in Figure 4C, in 7-day banded mice, the reductions in the myocardial expression of FAK induced by siRNA_{FAK} were accompanied by a proportional reduction in the amount of phosphorylated FAK.

We found that blood pressure, heart rate, and structure and function of LVs were unaffected by siRNA_{FAK} in SO mice, indicating that FAK knockdown does not influence basal

cardiac function or structure; thus the data of 6-week SO mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} were used as controls for the comparisons with banded mice. Treatment with siRNA_{GFP} did not affect the typical changes of the LV induced by chronic pressure overload (Figure 4D, black bars). Pretreatment with siRNA_{FAK} retarded the load-induced left ventricular hypertrophy, an effect that paralleled the FAK protein silencing. Transient FAK silencing markedly attenuated the dilatation as well as the reduction of left ventricular fractional shortening seen at the first week after aortic banding (Figure 4D, empty bars). In addition, the transient FAK silencing abolished the reduction of fractional shortening, although it did not change the dilatation of the LVs in 12-week banded mice. Notably, no differences were seen in the systolic gradient across the aortic constriction between mice injected with siRNA_{GFP} or siRNA_{FAK} (supplemental Table II).

The average diameter of cardiac myocytes was reduced in banded mice treated with siRNA_{FAK} in comparison with those treated with siRNA_{GFP} (Figure 5A). In addition, FAK silencing was shown to attenuate the rise of the hypertrophic marker gene β -MHC induced by aortic banding (Figure 5B).

LV interstitial fibrosis of aortic-banded mice treated with siRNA_{FAK} was attenuated, as compared with that of mice treated with siRNA_{GFP} (Figure 5C through 5F). This was accompanied by attenuation of the increases in the LV collagen content induced by pressure overload, as indicated by the analysis of myocardial hydroxyproline in banded mice treated with siRNA_{FAK} (Figure 5G). Moreover, FAK silencing prevented the increases in the zymo-

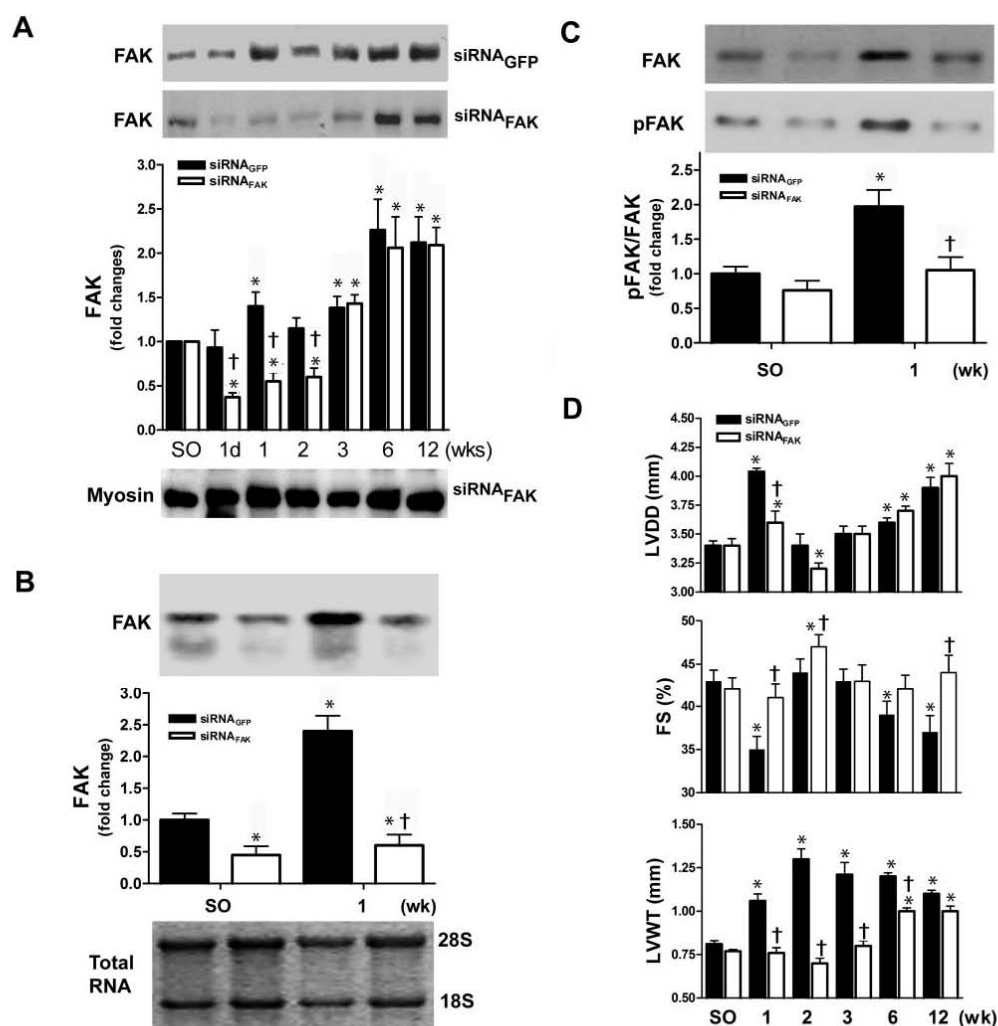


Figure 4. FAK silencing prevents the hypertrophy and retards the deterioration of chronically overloaded mice left ventricle. Mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} (15 μ g) on the day before aortic banding and followed up for 1 to 12 weeks. **A**, FAK and myosin expression. The bar graph shows the average changes in FAK normalized by the amount of myosin in the samples. **B**, Representative Northern blot of total RNA from 7-day aortic-banded mice and mice treated with siRNA. The bar graph shows the average changes in the densitometric values of myocardial FAK mRNA. Representative loading control of 28S and 18S bands from mice treated with siRNA_{FAK}. **C**, FAK and pFAK expression from 1-week siRNA-treated mice. The bar graph shows the average changes of the pFAK/FAK ratio. **D**, Bar graphs indicating the average values of echocardiographic mouse LV dimensions. * $P < 0.05$ compared with values of SO mice, † $P < 0.05$ compared with values of banded mice.

gram gel lysis for MMP-2 induced by aortic banding. As shown in Figure 5H, LV samples from mice treated with siRNA_{GFP} displayed increased gel lysis, whereas in samples from mice treated with siRNA_{FAK}, this lysis was comparable to that from control mice treated with siRNA_{GFP} or siRNA_{FAK}. In fibroblasts harvested from 7-day banded mice, we confirmed the increases in FAK and MMP-2 expression induced by pressure overload and, additionally,

we showed that FAK silencing canceled the rise in the expression of MMP-2 (Figure 5I).

siRNA_{FAK} Reverses Established LV Hypertrophy

We next examined whether systemically administered siRNA_{FAK} could reverse already-existing load-induced left ventricular hypertrophy. In these experiments, siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} were administered to 4-week aortic-banded

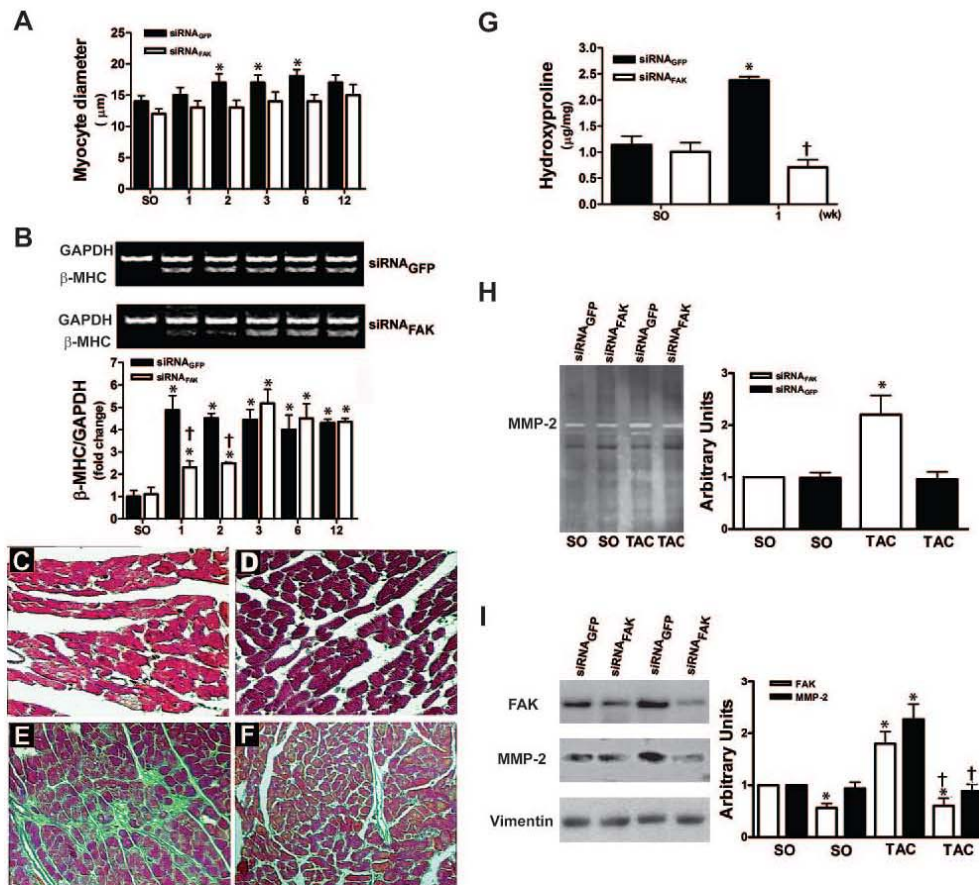


Figure 5. FAK silencing prevents the myocyte hypertrophy and fibrosis in the chronically overloaded mouse LVs. **A**, Mice treated with a single dose (15 μg) of siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} on the day before aortic-banding surgery and followed up for 1 to 12 weeks. The bar graph indicates the average cardiac myocyte diameter. **B**, Representative multiplex RT-PCR gel of β-MHC and GAPDH mRNA expression. The bar graph shows the average values of myocardial β-MHC mRNA expression, normalized by the GAPDH. **C**, Low magnification (×400) of Masson trichrome staining from SO mice treated with siRNA_{FAK}. **D**, Low magnification (×400) of Masson trichrome staining from SO mice treated with siRNA_{GFP}. **E**, Low magnification (×400) of Masson trichrome staining from 6-week banded mice treated with siRNA_{FAK}. **F**, Low magnification (×400) of Masson trichrome staining from 6-week banded mice treated with siRNA_{GFP}. **G**, Graph shows the LV content of hydroxyproline from 7-day aortic-banded and treated mice. **H**, Representative gelatin zymography from samples of normal and overloaded (7 days) LVs from mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP}. The bar graph shows the average densitometric values of MMP-2 zymographic activity. **I**, Representative examples of Western blots performed with anti-FAK, anti-MMP-2, and anti-vimentin antibodies and extracts from fibroblasts harvested from the LVs of 7-day SO or banded mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP}. The graphs indicate the values of FAK or MMP-2 normalized by vimentin. **P*<0.05 compared with values of SO mice, †*P*<0.05 compared with values of banded mice. TAC indicates transverse aortic constriction.

mice with established hypertrophy but preserved left ventricular function. siRNA_{FAK} reduced myocardial FAK expression (Figure 6A) to levels comparable to those of control mice (Figure 2). Typical structural and functional deterioration were seen in the LVs of banded mice treated with siRNA_{GFP} (Figure 6B and supplemental Table III). In contrast, siRNA_{FAK} reversed the left ventricular hypertrophy in banded mice. Noticeably, despite the regression of the hypertrophy, these mice had preserved left ventricular fractional shortening and less dilatation than those treated

with siRNA_{GFP}. These differences occurred despite the similarities in the increases of systolic aortic blood pressure and transconstriction gradient in both groups. In addition, siRNA_{FAK} attenuated the increases in cardiac myocyte diameter and interstitial fibrosis in banded mice (supplemental Table III). Figure 6C and 6D shows representative examples of myocardial samples from banded mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP}. As shown in Figure 6E, survival was significantly higher in banded mice treated with siRNA_{FAK} than in those treated with siRNA_{GFP}.

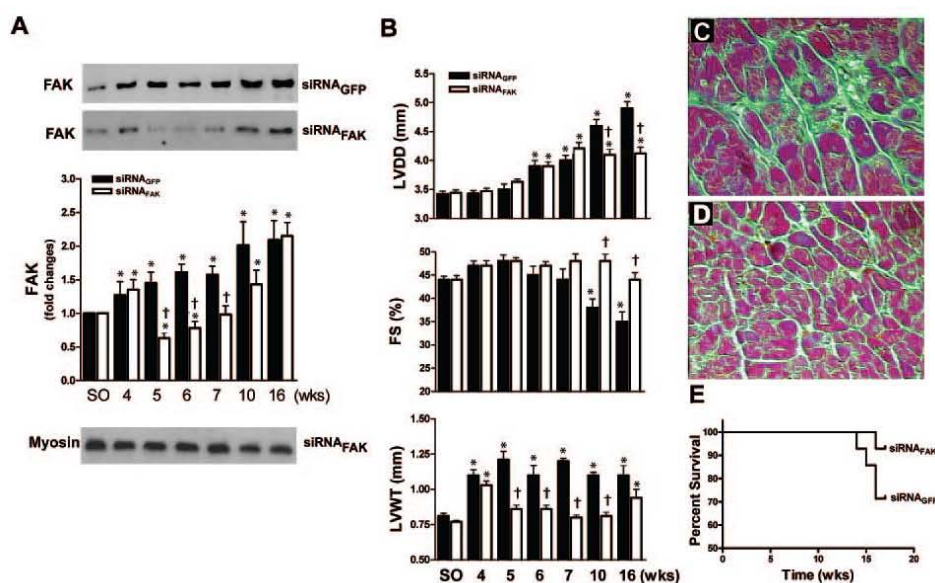


Figure 6. FAK silencing reverses the hypertrophy and retards the deterioration of chronically overloaded mice left ventricle. Four-week aortic-banded mice treated with of siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP} (15 μ g) followed up for 1 to 12 weeks after treatment. **A**, FAK and myosin expression. The bar graph shows the average changes in the densitometric values of FAK normalized by myosin. **B**, Bar graphs indicating the average values of echocardiographic mouse LV dimensions. LVWT, indicates left ventricular wall thickness. **C**, High magnification ($\times 1200$) of Masson trichrome staining from 6-week mice treated with siRNA_{GFP}. **D**, High magnification ($\times 1200$) of Masson trichrome staining from mouse LVs after 6 weeks of siRNA_{FAK} injection. **E**, Graph showing the percentage survival in banded mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP}. * $P < 0.05$ compared with values from 4 week banded mice, † $P < 0.05$ compared with values from banded mice treated with siRNA_{GFP}.

Discussion

The ability of systemically administered synthetic siRNA to efficiently reduce the amount of a specific target protein has been demonstrated in few disease models. In this study, we report the development of a strategy to target myocardial FAK by siRNA and demonstrate that transient myocardial FAK silencing can prevent, as well as reverse, mouse LV hypertrophy induced by aortic banding, despite the persistence of the pressure overload.

In Vivo FAK Silencing by siRNA

We demonstrated that a single intravenous injection of specific siRNA provided a prolonged reduction in FAK expression in both normal and hypertrophic mouse LVs. Importantly, we confirmed the silencing of FAK in cardiac myocytes and fibroblasts, thereby suggesting that myocyte and nonmyocyte myocardial cell populations may be equally susceptible to gene silencing by the RNA interference strategy reported here. These results indicate the feasibility of the use of RNA interference in the LVs, by using bolus injections via the jugular vein of naked siRNA, despite the expected low stability and poor cellular uptake of siRNA.^{18,20} Although such factors indeed limit the strategy of delivering siRNA systemically, it has been shown to be possible to circumvent such obstacles by administering comparatively large amounts of siRNA selectively into the organ where it needs to be delivered.^{19,21} Accordingly, we demonstrate herein that a

modified strategy of local injection, ie, a bolus injection of a comparatively concentrated siRNA into the jugular vein, was effective in reducing FAK expression in the mouse LVs. The relatively modest FAK silencing in the kidney and the lack of silencing in the liver, as well as the demonstration that hydrodynamic injections of siRNA_{FAK} via the tail vein did not change FAK expression in the mouse LVs further support the efficiency of the jugular delivery to induce in vivo gene silencing by naked siRNA. However, the relatively large amounts of siRNA_{FAK} needed to obtain an efficient gene silencing might induce nonspecific and off-target effects and limit the use of this strategy. In this regard, a major nonspecific effect related to high concentrations of siRNA, observed as the interferon response,²² was shown to be absent in the mice of the present study. We also demonstrated that the treatment with siRNA_{FAK} did not affect the expression of the FAK-related proline-rich tyrosine kinase 2 or the unrelated proteins extracellular signal-regulated kinase 1/2 or cardiac myosin, suggesting a lack of major off-target effects of this sequence. This is in agreement with recently reported data indicating that the majority of the off-target effects with systemic delivery of siRNA were attributable to the lipid-based transfection reagent and not to the siRNA.²³

Remarkably, only at the third week after siRNA_{FAK} injections did myocardial FAK transcript and protein expression recover to the levels seen in the LVs from mice that were treated with siRNA_{GFP}. Although we did not expect such a

prolonged effect, previous observations^{24,25} have indicated that gene silencing induced by naked siRNA may be effective for weeks. Such a prolonged effect has been attributed to the stability of the interaction of the active strand of siRNA with the RISC complex, which may persist for weeks, depending on the rate of cell division and the presence of the target mRNA within the cells.^{26,27} In this regard, it is worth mentioning that cardiac myocytes do not proliferate at a significant rate in normal or diseased hearts, although the other myocardial cell types may proliferate in response to pathophysiological stimuli. Interestingly, siRNA_{FAK} reduced the myocardial FAK expression to comparable levels in the LVs of control and banded mice, indicating that the trophic influences of pressure overload did not affect the efficiency of siRNA in silencing myocardial FAK.

Effects of FAK Silencing in Chronically Overloaded LVs

A major finding of this study was that transient reductions of myocardial FAK expression by the RNA interference strategy markedly attenuated the development and reversed already-established left ventricular hypertrophy in aortic-banded mice. This implies that FAK is necessary not only to the development of but also to sustain LV hypertrophy in response to chronic pressure overload. The demonstration that reductions in FAK expression were paralleled by attenuation of the cardiac myocyte hypertrophy and expression of the hypertrophic gene marker β -MHC supports the conclusion that FAK silencing attenuates hypertrophic growth by affecting the responses of the cardiac myocytes to pressure overload. This is in line with previous data indicating that FAK is crucially involved in the hypertrophic response of cardiac myocytes to mechanical stress.^{6,7,14,15} However, influences arising in consequence of FAK silencing in the vessels of the peripheral circulation or neurohormonal factors might arguably contribute to the attenuation of the left ventricular hypertrophy in banded mice treated with siRNA_{FAK}. Although we cannot exclude neither a significant FAK gene silencing in the systemic vasculature nor a reduction in the vascular resistance in banded mice treated with siRNA_{FAK}, the demonstration here that mice treated with siRNA_{FAK} or siRNA_{OFF} had comparable transconstriction systolic gradients and increases in blood pressure in ascending aorta indicate that it is unlikely that reductions in the vascular resistance contributed substantially to the attenuation of the hypertrophic growth in mice treated with siRNA_{FAK}. Further studies are necessary, however, to examine whether changes in coronary microcirculation or in the activity of the neurohormonal systems (eg, renin-angiotensin system) contribute to the antihypertrophic effect of myocardial FAK silencing.

Importantly, besides attenuating the hypertrophic growth, FAK silencing also mitigated the ongoing structural and functional deterioration of the hypertrophic LVs. Moreover, it has been shown that the abnormalities of chronically overloaded LVs were paralleled by enhanced myocardial FAK expression and activity. Thus, we reasoned that the persistently activated FAK signaling may be detrimental to hypertrophied LVs. This is apparently in conflict with the obser-

vations in myocyte restricted knockout mice^{14,15} that have indicated that depletion of FAK predisposes to a premature maladaptive remodeling of chronically overloaded LVs. We postulate that such contrasting effects might be related to the fact that myocardial FAK silencing, in contrast to the myocyte-restricted knockout, may attenuate the development of fibrosis by lowering FAK expression in fibroblasts, in addition to cardiac myocytes, favoring a better outcome of chronically overloaded LVs. The results of this study indeed support this hypothesis. Our results showed that the sites of myocardial fibrosis displayed remarkable anti-FAK staining, suggesting an activation of FAK signaling in the sites of fibrosis, as has been suggested previously in rat and human hypertrophied LVs.^{9,13} Accordingly, we demonstrated here that fibroblasts harvested from the LVs of 7-day banded mice had increased FAK expression. Moreover, it was shown here that the beneficial effects of FAK silencing in the hypertrophic remodeling of LVs was paralleled by a marked attenuation in the interstitial fibrosis, suggesting a role for FAK in the myocardial fibrogenesis induced by chronic pressure overload. Indeed, myocardial FAK silencing was shown to be accompanied by attenuation in the rises of myocardial collagen and MMP-2 activity, and, importantly, it was shown here that FAK silencing in fibroblasts harvested from overloaded myocardium was accompanied by a reduction in the MMP-2 expression, a molecule that has been shown to be a major determinant of the extracellular matrix remodeling process in overloaded myocardium.^{28,29}

In summary, this study provides crucial information for the understanding of the importance of FAK signaling in the pathophysiology of cardiac hypertrophy and failure induced by chronic pressure overload. Furthermore, the demonstration that FAK silencing may prevent cardiac hypertrophy and its deterioration to maladaptive remodeling highlights the potential of FAK targeting by siRNA as an applicable therapeutic tool that may ameliorate remodeling and the outcome of cardiovascular diseases that evolve with hypertrophy and heart failure.

Sources of Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo grants 01/11698-1 and 04/10167-0 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico grant CNPq 521098/97-1.

Disclosures

None.

References

1. Katz AM. The cardiomyopathy of overload: an unnatural growth response in the hypertrophied heart. *Ann Intern Med.* 1994;121:363-371.
2. Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:H8-H16.
3. Diwan A, Dorn GW 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. *Physiology (Bethesda, Md).* 2007;22:56-64.
4. Houser SR, Margulies KB. Is depressed myocyte contractility centrally involved in heart failure? *Circ Res.* 2003;92:350-358.
5. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation.* 1997;96:4065-4082.

6. Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W Jr, Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2003;93:140–147.
7. Nadruz W Jr, Corat MA, Marin TM, Guimaraes Pereira GA, Franchini KG. Focal adhesion kinase mediates MEF2 and c-Jun activation by stretch: role in the activation of the cardiac hypertrophic genetic program. *Cardiovasc Res*. 2005;68:87–97.
8. Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289:H1488–H1496.
9. Ebble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H1695–H1707.
10. Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2000;275:19250–19257.
11. Kovacic-Milivojevic B, Roediger F, Almeida EA, Damsky CH, Gardner DG, Ilic D. Focal adhesion kinase and p130Cas mediate both sarcomeric organization and activation of genes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *Mol Biol Cell*. 2001;12:2290–2307.
12. Bayer AL, Heidkamp MC, Patel N, Porter MJ, Engman SJ, Samarel AM. PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H695–H706.
13. Lopes MM, Ribeiro GC, Tornatore TF, Clemente CF, Teixeira VP, Franchini KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. *Clin Sci (Lond)*. 2007;113:195–204.
14. Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A, Ji G, Cheng L, Yang Q, Kotlikoff MJ, Chen J, Chien K, Gu H, Guan JL. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 2006;116:217–227.
15. DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP, Taylor JM. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res*. 2006;99:636–645.
16. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115:209–216.
17. Barreto-Chaves ML, Aneas I, Krieger JE. Glucocorticoid regulation of angiotensin-converting enzyme in primary culture of adult cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;280:R25–R32.
18. Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol*. 2003;327:761–766.
19. Modlinger P, Chabashvili T, Gill PS, Mendonca M, Harrison DG, Griendling KK, Li M, Raggio J, Wellstein A, Chen Y, Welch WJ, Wilcox CS. RNA silencing in vivo reveals role of p22phox in rat angiotensin II pressor response. *Hypertension*. 2006;47:238–244.
20. Dykxhoorn DM, Lieberman J. Knocking down disease with siRNAs. *Cell*. 2006;126:231–235.
21. Hamar P, Song E, Kokeny G, Chen A, Ouyang N, Lieberman J. Small interfering RNA targeting Fas protects mice against renal ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14883–14888.
22. Bridge AJ, Pebernard S, Ducaux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet*. 2003;34:263–264.
23. Fedorov Y, King A, Anderson E, Karpilow J, Ilsley D, Marshall W, Khvorova A. Different delivery methods-different expression profiles. *Nat Methods*. 2005;2:241.
24. Palliser D, Chowdhury D, Wang QY, Lee SJ, Bronson RT, Knipe DM, Lieberman J. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*. 2006;439:89–94.
25. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seifert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Kotliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in nonhuman primates. *Nature*. 2006;441:111–114.
26. Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, Cerny J, Sharp PA, Lieberman J, Manjunath N, Shankar P. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol*. 2003;77:7174–7181.
27. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, Chen J, Shankar P, Lieberman J. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 2003;9:347–351.
28. Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1384–1391.
29. Bergman MR, Teerlink JR, Mahimkar R, Li L, Zhu BQ, Nguyen A, Dahi S, Karlner JS, Lovett DH. Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am J Physiol*. 2007;292:H1847–H1860.

EXPANDED MATERIALS AND METHODS

Antibodies and Chemicals. Polyclonal rabbit antibody against FAK, PYK2 and ERK1/2, were purchased from Santa Cruz Biotechnology (USA). Polyclonal rabbit antibody against pFAK (Tyr-397) was obtained from Biosource (USA). Monoclonal mouse antibody against cardiac myosin heavy chain was obtained from Abcam, Inc (USA). Collagenase type IA, trypsin and hydroxyproline were from Sigma (USA). Affinity-purified anti-rabbit IgG was from DAKO. Trizol, Super Script II [¹²⁵I]Protein A and [α -³²P]ATP were from Amersham. Ampliscribe T7 high yield transcription was from Epicentre. Endogen Mouse IFN γ Elisa Kit was from Pierce.

Mice. Swiss mice (6–8 week old) were handled in compliance with the principles of laboratory animal care formulated by the Animal Care and Use Committee of the State University of Campinas. Procedures such as jugular vein catheterization, aortic banding, echocardiographic examination and arterial vessels catheterization for blood pressure monitoring were performed under anesthesia with a mixture of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine (5 mg/Kg). For the injections of siRNA, the jugular vein was cannulated with a flame stretched PE50 polyethylene tube. Aortic banding was performed by transverse aortic constriction (TAC) by tying a 7-0 nylon (Dafilon; B.Braun Melsungen AG, Germany) suture ligature against a 27-gauge needle. For the blood pressure monitoring the right carotid and the right femoral arteries were cannulated with flame stretched PE-50 polyethylene tube. Blood pressure in the carotid and femoral arteries were simultaneously recorded for a 10 minute period to determine the transconstriction systolic gradient. The recordings were obtained from a COBE transducer (Arvada, USA), connected to a GP4A Stemtech amplifier (Stemtech, USA). The amplifier output was connected to an analog-to-digital board and this to a computer loaded with WINDAQ-PRO Data Acquisition software (DATAQ Instruments, USA), for continuous

blood pressure monitoring. Pulsatile blood pressure from carotid and femoral catheters were recorded in individual channels and sampled at 100-Hz.

Echocardiography. 2D M-mode echocardiography was performed with a 12-MHz probe connected to a Toshiba Power Vision system in anesthetized mice by a blinded observer at 15 min after the induction of anesthesia. The short axis measurements were taken at the level of the midpapillary muscle. Three measurements were taken at end-systole and end-diastole to determine left ventricular wall thickness, systolic and diastolic diameter and fractional shortening.

siRNA design and synthesis. siRNA targeted to mouse FAK gene was designed with a software developed by the co-authors of this manuscript T.C.Pereira and I.Lopes-Cendes. This software used internal stability parameters originally reported by Khvorova et al (1) to test the sequences *in silico*. The sequences were selected based on the highest trend to incorporate the antisense strand in the RISC complex. Given that the silence efficiency of siRNAs is variable, we tested multiple siRNAs sequences targeting to different regions of the mouse gene. We chose the three sequences based on the following criteria 1) highest probability to knockdown the gene according to the *in silico* analysis, 2) matching sequences from mouse FAK mRNA and, 3) homology to rat FAK mRNA. These sequences were initially tested in neonatal rat ventricular myocytes. The sequence which was the most effective in inducing FAK silencing in myocytes was then tested in mice. DNA oligonucleotides (i) T7: 5'-GGTAATACGACTCACTATAG-3'. (ii): FAK sense (AB030035): 5'-GCGAAATCCATAGCAGGCCACTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (iii) FAK antisense 5'-ACGTGGCCTGCTATGGATTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (iv) GFP sense: 5'-GTGTCTTGTAGTTCCCGTCTATAGTGAGTCGTATTACC-3'. (v)

GFP antisense: 5'-ATGACGGGAAC TACAAACACCTATAGTGAGTCGTATTACC-3' were ordered from IDT (USA). The oligonucleotide-directed production of small RNA transcripts with T7 RNA polymerase were made with Ampliscribe™ T7 transcription kit (Epicentre Biotechnologies; Madison WI, USA) according to manufacturer's instructions.

siRNA injections. siRNA (15 µg) was diluted in PBS buffer (300 µL) and injected in bolus through a catheter positioned in the right jugular vein.

Isolation of adult mouse ventricular myocytes and fibroblasts. Mouse cardiac myocytes and fibroblasts were isolated from mice one day after treatment with siRNA^{FAK} or siRNA^{GFP} by a method modified from a previously published method (2). Mice were anesthetized and treated with 500 UI of heparin. The ascending aorta was cannulated for retrograde perfusion, right atrium was cut and the heart was perfused at 2.2mL/min with 5mL of perfusion buffer (118mM NaCl, 25mM NaHCO₃, 1.2mM KH₂PO₄, 4.7mM KCl, 1.2mM MgSO₄, 10mM Hepes free acid, 10mM glucose, 0.1mL/L insulin) and then switched to 30mL of perfusion buffer plus with 1g/L BSA and collagenase type IA (0,3 mg/mL; Sigma). The heart was quickly removed from the chest, minced in small pieces, and digested with 3mL of perfusion buffer with 1g/L BSA and trypsin (0,1mg/mL). Dissociated cells were centrifuged at 3.000 rpm for 5 minutes at the end of each several incubation and cell pellet was resuspended in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and antibiotics (Penicillin and streptomycin, Nutricell). Cells were seeded into a 90mm plastic dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂. After 2 hours, unattached cells that corresponded most to cardiomyocytes were harvested by centrifugation at

3000 rpm for 5 minutes. Cell pellet was then resuspended in buffer (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM NaHPO₄; 100mM sodium fluoride; 10mM EDTA; 10mM Na₃VO₄; 2mM PMSF; 0.2 mg/ml aprotinin, 10% Triton-X 100) and cleared by centrifugation at 11000 rpm, 4°C. Extracts containing 50µg total protein were resolved in SDS-PAGE and assayed by western blotting.

Fibroblasts were harvested from mice LV according to a previously described method (3). The hearts were quickly excised from the chest, minced and washed in PBS supplemented with antibiotics (penicilin 100U/mL and streptomycin 100mg/mL, Nutricell). The tissue was then incubated at 37°C for 20 minutes with PBS containing 272 UI/mL of collagenase type 1A (Sigma), 0,1% trypsin (Sigma), 0.1% BSA and 0,01% antibiotics. Dissociated cells were centrifuged at 3.000 rpm for 5 minutes and at the end of each of several incubations, the cell pellet was resuspended in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and antibiotics (Penicillin and streptomycin, Nutricell). Cells were seeded into a 90mm plastic dish and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5%CO₂. After 2 hours, unattached cells and debris were discarded, and attached cells (mostly fibroblasts) were harvested in buffer (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM NaHPO₄; 100mM sodium fluoride; 10mM EDTA; 10mM Na₃VO₄; 2mM PMSF; 0.2 mg/ml aprotinin, 10% Triton-X 100) and cleared by centrifugation at 11.000 rpm, 4°C. Extracts containing 50µg total protein were resolved in SDS-PAGE and assayed by western blotting analysis.

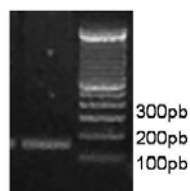
Western blotting. Heart, lung, kidney or liver were harvested in buffer (100mM Tris-HCl pH 7.4; 100mM NaHPO₄; 100mM sodium fluoride; 10mM EDTA; 10mM Na₃VO₄; 2mM PMSF; 0,2 mg/ml aprotinin, 10% Triton-X 100) and cleared by centrifugation at 11.000 rpm, 4°C. Extracts containing equal amounts of total protein

(50µg) were resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% nonfat milk solution for 30 minutes, the membranes were incubated with primary antibodies in 3% nonfat milk solution overnight at 4°C. ¹²⁵I-protein A were used for detection of specific bands and the membranes were exposed to XAR film. Equal protein loading was confirmed by Coomassie staining of the gel.

Northern blotting. Total RNA samples were prepared using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Samples of total RNA (15µg) were resolved by electrophoresis in denaturing gel (1.2% agarose and 2.2M formaldehyde) and blotted onto a positively charged nylon membrane. The membrane was pre-hybridized for 4h at 40°C in 5x SSC, 50% formamide, 5x Denhardt's solution, 0.5% SDS and 100µg/mL denatured salmon sperm DNA. ³²P-labelled oligonucleotide probes (110pb) were generated by RT-PCR reaction from mice heart cDNA using the primers: FAK sense (AB030035): 5'- ATGTTCTGGTGTCTCAAATG-3' and FAK antisense (AB030035): 5'-GAGGTAAAACGTCGAAAATTG-3'. Hybridization was carried out at 42°C overnight. The membranes were washed two times in 2x SSC, 0.1% SDS for 15 minutes at 37°C and exposed to XAR film. The 28S and 18S rRNA bands were used as loading control.

To generate ³²P-labelled oligonucleotide probe, we performed a RT-PCR reaction with mice heart cDNA using specific FAK primers. A 5-µg aliquot of heart total RNA was used for cDNA synthesis with the Superscript preamplification system (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. cDNA was amplified by PCR using *Taq* DNA polymerase and FAK oligonucleotides. The amplification conditions consisted of 40 cycles as follows: denaturing at 94°C for 2 min, annealing at

51°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. These resulted in a PCR product of 110pb, as showed in Online Figure 1.



Online Figure 1. RT-PCR of FAK in mouse heart cDNA .

Zymography. Samples of ~150 mg of mice LV were frozen into liquid nitrogen, and then homogenized in 500 μ L of extraction buffer (50mM Tris HCl pH 7.4, 0.2M NaCl, 0.1% Triton X-100, 10mM CaCl_2 , 10 μ L/mL protease inhibitor cocktail - Sigma). After incubating in ice (2 hours), the samples were centrifuged (4 °C, 20 min, 4000 rpm) and the final protein concentration of the extracts was determined by Bradford method. The samples were diluted to a final concentration of 5 μ g/ μ L in water and 25 μ g protein (5 μ L) plus 10 μ L of non-denaturing loading buffer (0,0875M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 25% glycerol e 0,01% bromofenol blue) were loaded and resolved by SDS-PAGE containing 0.1% of gelatin, at 100 volts, 4 °C. The gels were washed twice with wash buffer (100mM Tris-HCl, 2,5% Triton-X 100) and incubated for 24h in a matrix metalloproteinase substrate buffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 0,1M NaCl, 1M CaCl_2 , 0,02% NaNO_3) at 37°C. After incubation, the gels were stained using a comassie blue solution (0.5% Comassie Blue R-250, 50% methanol, 10% acetic acid) for 2 hours and then washed in 30% ethanol / 10% acetic acid solution. The zymograms were digitized and the size-fractionated banding pattern, which indicated MMP proteolytic activity, was determined by image analysis.

LV Hydroxyproline. Samples (20-30 mg) of LV posterior wall were used in quantitative estimation of myocardial hydroxyproline. Weighed amounts of heart small slices were digested in 6N HCl, in proportion of 10mg tissue to 1mL of acid, at 130°C for 6h. 5µL of the extract was diluted in 2mL of water and oxidized with 1mL of chloramine T solution (1.41% chloramine T, 10% n-propanol, 80%) in buffer pH6 (5% citric acid, 1.2% acetic acid, 12% sodium acetate, 3.4% NaOH)) for 20 minutes at room temperature. The mixture was then heated with 1mL of p-dimethylaminobenzaldehyde solution (15% p-dimethylaminobenzaldehyde, 60% n-propanol, 26% perchloric acid 60%) at 60°C for 20 minutes. Full color development reached in 15 minutes. Samples were then read at 550nm in spectrophotometer. A standard calibration curve was plotted for hydroxyproline (Sigma), ranging from 0.1 µg/mL to 3 µg/mL. Hydroxyproline content in the myocardium was expressed in µg/mg fresh tissue weight.

Interferon γ assay. Plasma samples were obtained from mice at periods ranging from 1 to 28 days after treatment with siRNA_{FAK} or siRNA_{GFP}. Plasma Interferon γ concentration was obtained with Endogen Mouse INF γ Elisa kit (Pierce) according to manufacturer's instructions.

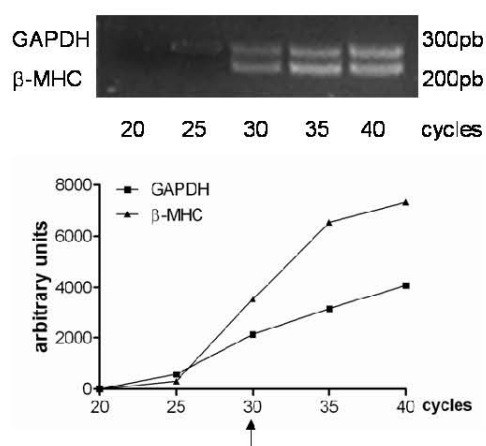
Histological Examination. Hearts were rapidly excised from fully anesthetized mice and washed in PBS. The hearts were fixed in 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections of LV were stained with Masson's trichrome to measure the cardiac myocyte diameter and the interstitium in heart sections. Eight fields per section were digitized at a magnification of x20. Cardiac myocyte diameter was obtained from direct measurements of the samples and the area of fibrosis, indicated by green staining, was

outlined and quantified by digital image analysis. Fibrosis data are presented as the ratio of the area of interstitium to the total myocardial area.

Immunohistochemistry. Hearts were rapidly excised from fully anesthetized mice and washed in PBS. The hearts were fixed in 10% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were transferred to poly-L-lysine-coated glass slides. The endogenous peroxidase activity was blocked by treatment with 0.03% H₂O₂ in 0.1M PBS at room temperature for 30 minutes. The sections were incubated in 10mM citrate buffer pH6.0 for 30 minutes at 95°C for antigenic recovery. After that, the sections were preincubated in blocking buffer (5% BSA on 0.1M PBS) for 45 minutes at 37°C, followed by overnight incubation with the primary anti-FAK (1:50) antibody in 1% BSA solution at 4°C. The sections were extensively rinsed in 0.05M PBS and incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (Envision peroxidase system, DAKO) for 1 hour at 25°C. After washing as above, sections were subjected to freshly prepared diaminobenzidine that contained H₂O₂ (0.8%) for 5 minutes. Secondary antibody specificity was tested in a series of positive and negative control measurements. In the absence of primary antibodies, application of secondary antibodies (negative controls) failed to produce any significant staining.

RT-PCR analysis. Multiplex one step RT-PCR was performed in a 50 μ L of reaction mixture containing 10 μ L of first strand buffer (Invitrogen), 1 μ L dNTP (40mM), 25ng of each GAPDH primer (GAPDH S- 5' GGCATTGCTCTCAATGACAA 3', GAPDH AS- 5' AGGGTGCAGHGGAACTTTATT 3'), 50ng of each β -MHC primer (β -MHC S- 5' GCCAACACCAACCTGTCCAAGGTTC 3' and β -MHC AS- 5' TGAAAAGGC TCCAGGTCTGAGGGC 3'), 0.5 μ L *Taq* DNA polymerase and 1 μ L of Super Script II (diluted 1:16), made up to 50 μ L with RNase-free water. 50ng of heart total RNA,

extracted with Trizol, was added. Oligonucleotides were synthesized by IDT. One step RT-PCR was carried out under the following conditions: incubation at 42 °C for 30 minutes followed by denaturation at 95 °C for 2 min and then 30 amplification with denaturation at 95 °C for 15 seconds, annealing at 47°C for 1 minute and extension at 72 °C for 2 min. A negative control was included in each run. PCR products were size fractionated with agarose gel electrophoresis. After the gels were stained with ethidium bromide, the DNA bands were visualized with a UV transilluminator. β -MHC amplicon was about 200pb and GAPDH, 300pb. GAPDH bands were used as internal controls. The number of the amplification cycles were adjusted based on a curve that was built by using 50ng of total heart RNA, 25ng of each GAPDH primer (sense and antisense) and 50ng of each β -MHC primer (sense and antisense). 30 cycles were chosen based in the curve shown in Online Figure 2.



Online Figure 2. Amplification curve of one step RT-PCR performed with 50ng of total heart RNA, 25ng of each GAPDH primer (sense and antisense) and 50ng of each β -MHC primer (sense and antisense). Upper panel: One step RT-PCR of GAPDH and β -

MHC in heart total RNA. Bottom panel: graphic showing the relationship between mRNA expression and number of amplification cycles.

REFERENCES

1. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S. Functional siRNAs and miRNAs exhibits strand bias. *Cell*. 2003; 115: 209-216.
2. Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res*. 2005;96:73-81.
3. Barreto-Chaves M, Anéas I, Krieger J. Glucocorticoid regulation of angiotensin-converting enzyme in primary culture of adult cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2001; 280: R25-R32.

Supplementary Table 1

Echocardiography and morphometric evaluation of hypertrophic mice hearts

	<i>SO</i>			<i>Banded</i>		
Number	8	1 wk 9	2 wk 8	3 wk 7	6 wk 8	12 wk 8
Hemodynamics						
SBPAS (mmHg)	116 ± 3	165 ± 2*	166 ± 2*	179 ± 5*	179 ± 6*	175 ± 4*
SBPF (mmHg)		119 ± 5	122 ± 3	130 ± 4	132 ± 5	130 ± 4
SGr (mmHg)		46 ± 3	44 ± 2	49 ± 3	47 ± 4	46 ± 4
HR	620 ± 28	644 ± 37	637 ± 35	618 ± 31	654 ± 45	686 ± 46
Echocardiography						
LVEDD (mm)	3.5 ± 0.05	3.9 ± 0.1*	3.5 ± 0.08	3.5 ± 0.09	3.6 ± 0.1	4.0 ± 0.1*
LVESD (mm)	2.0 ± 0.04	2.4 ± 0.08*	2.1 ± 0.05	2.0 ± 0.04	2.1 ± 0.05	2.4 ± 0.07*
LVWT (mm)	0.8 ± 0.02	1.0 ± 0.05*	1.3 ± 0.04*	1.2 ± 0.02*	1.1 ± 0.04*	1.2 ± 0.05*
FS (%)	43 ± 1.1	35 ± 1.9*	44 ± 2.0	40 ± 2.1	38 ± 1.8	36 ± 1.7*
Organ Morphometry						
BW	30 ± 1	27 ± 0.8	30 ± 0.6	32 ± 0.6	35 ± 0.8*	37 ± 0.9*
LVMI (mg/g)	2.8 ± 0.2	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.1*	3.9 ± 0.2*	4.0 ± 0.3*	4.6 ± 0.3*
CMD (μm)	13 ± 0.7	15 ± 0.5	16 ± 0.2*	18 ± 0.3*	19 ± 0.4*	18 ± 0.4*
IA (%)	3.6 ± 0.1	5.7 ± 0.3	7.2 ± 0.3*	7.0 ± 0.8*	9.0 ± 0.7*	13 ± 0.8*

SO, sham-operated; TAC, transverse aorta constricted; SBPAS, systolic blood pressure in ascending aorta; SBPF, systolic blood pressure in femoral artery; SGr, systolic gradient; HR, heart rate; LVEDD, left ventricle end diastolic diameter; LVESD, left ventricle end systolic diameter; LVWT, left ventricle posterior wall thickness; FS, left ventricle fractional shortening; BW, body weight; LVMI,

left ventricle mass index; CMD, cardiac myocyte diameter; IA, interstitium area. Data are presented as mean values \pm SEM. Differences between the groups were tested by ANOVA and Bonferroni's multiple-range test. $P < 0.05$ indicated statistical significance compared to values of SO mice.

Supplementary Table 2

Echocardiography and morphometric evaluation of hypertrophic hearts from mice treated with siRNA.

	<i>siRNA_{GFP}</i>						<i>siRNA_{FAK}</i>					
Number	SO 11	1wk 8	2wk 10	3wk 8	6wk 8	12wk 9	SO 9	1 wk 9	2 wk 8	3 wk 10	6 wk 9	12wk 9
Hemodynamics												
SBPAS(mmHg)	112±4	167±5*	172±7*	168±8*	164±5*	167±6*	107±5	160±6*	157±5*	168±4*	166±6*	162±7*
SBPF(mmHg)		115±5	121±3	120±5	118±4	127±6		115±5	111±4	122±4	126±5	121±6
SGr (mmHg)		43±3	50±2	48±5	47±2	41±3		46±4	45±3	46±2	41±4	42±3
HR	592±33	665±46	621±43	587±51	610±46	663±54	611±37	648±52	654±49	633±43	641±48	647±47
Echocardiography												
LVEDD (mm)	3.4±0.04	4.1±0.03*	3.4±0.1	3.5±0.07	3.6±0.04*	3.9±0.09*	3.4±0.06	3.6±0.1*†	3.2±0.05*	3.5±0.07	3.7±0.04*	4.0±0.1*
LVESD (mm)	2.0±0.1	2.5±0.2*	1.9±0.2	2.0±0.3	2.1±0.2	2.4±0.2*	2.0±0.1	2.1±0.2	2.0±0.1	1.9±0.1	2.1±0.2	2.4±0.2*
LVWT (mm)	0.8±0.02	1.1±0.04*	1.3±0.06*	1.2±0.07*	1.2±0.02*	1.1±0.02*	0.8±0.01	0.8±0.03†	0.7±0.03†	0.8±0.03†	1.0±0.02*†	1.0±0.03*
FS (%)	43±1.3	35±1.5*	44±1.6	43±1.4	39±1.6*	37±1.9*	42±1.4	41±1.7†	47±1.4*†	43±1.9	42±1.7	44±2.0†
Morphometry												
BW	30±1.0	27±1.1	29±0.9	28±0.9	30±1.1	40±1.7*	27±0.8	24±1.2	26±1.3	29±0.9	35±1.3	42±1.8*
LVMI (mg/g)	2.9±0.1	3.6±0.1*	3.8±0.2*	3.7±0.2*	3.9±0.2*	4.4±0.3*	2.7±0.1	2.8±0.1†	2.8±0.1†	2.9±0.1†	3.3±0.4*	4.1±0.2*
CMD (μm)	14±0.9	15±1.2	17±1.4*	17±1.2*	18±1.1*	17±1.2	12±0.8	13±1.1	13±1.2	14±1.5	14±1.1	15±1.7
IA (%)	3.3±1.1	9.7±1.0*	8.9±0.5*	9.9±0.9*	7.2±0.6*	8.2±1.0*	3.2±0.5	4.7±0.5†	4.8±0.1†	5.0±0.5†	5.7±0.1*	7.2±1.1*

SO, sham-operated; TAC, transverse aorta constricted; SBPAS, systolic blood pressure in ascending aorta; SBPF, systolic blood pressure in femoral artery; SGr, systolic gradient; HR, heart rate; LVEDD, left ventricle end diastolic diameter; LVESD, left ventricle end systolic volume; LVWT, left ventricle posterior wall thickness; FS, left ventricle fractional shortening; BW, body weight; LVMI, left ventricle mass index; CMD, cardiac myocyte diameter; IA, interstitium area. Differences were tested by two-way ANOVA and

Bonferroni's multiple-range test. * $P < 0.05$ indicated statistical significance compared to values of SO mice. † $P < 0.05$ compared to values from banded mice treated with siRNA_{GFP}.

Supplementary Table 3

Echocardiographic and morphometric evaluation of hypertrophic hearts from mice treated with siRNA.

	<i>siRNA_{GFP}</i>					<i>siRNA_{FAK}</i>						
	4 wk	5 wk	6 wk	7 wk	10 wk	16 wk	4 wk	5 wk	6 wk	7 wk	10 wk	16 wk
Number	8	7	8	8	7	6	7	8	7	7	8	8
Hemodynamics												
SBPAS(mmHg)	169±4	171±3	176±5	173±6	172±7	176±5	165±5	166±5	178±5	172±5	171±10	170±1
SBPF(mmHg)	125±3	129±2	126±3	123±3	127±5	126±4	123±4	118±4	127±4	121±3	125±4	124±5
SGr (mmHg)	45±2	42±2	50±3	50±4	45±5	50±4	42±3	48±5	50±3	50±5	46±11	46±4
HR (bpm)	586±47	614±49	592±41	607±46	677±54	659±61	557±39	584±42	574±52	611±47	595±56	623±44
Echocardiography												
LVEDD (mm)	3.4±0.05	3.5±0.1	3.9±0.1*	4.1±0.1*	4.6±0.1*	4.9±0.1*	3.5±0.05	3.6±0.05	3.9±0.1*	4.2±0.1*	4.1±0.1**†	4.1±0.1**†
LVESD (mm)	1.9±0.1	1.8±0.1	2.2±0.1	2.3±0.1*	2.8±0.1*	3.0±0.1*	1.9±0.1	1.9±0.1	2.1±0.1	2.2±0.1	2.2±0.1†	2.3±0.2†
LVWT(mm)	1.1±0.04	1.2±0.06	1.1±0.07	1.2±0.02	1.1±0.02	1.1±0.07	1.0±0.01	0.9±0.02†	0.9±0.02†	0.8±0.02**†	0.8±0.03**†	0.9±0.06†
FS (%)	47±1.0	48±1.3	45±1.9	44±2.3	38±1.9*	35±2.1*	47±1.1	48±0.7	47±0.9	48±1.6	48±1.6†	44±1.5†
Morphometry												
BW (g)	34±0.8	34±0.20	29±2.5	36±0.7	41±1.7*	42±1.9*	37±1.1	35±1.3	31±2.0	39±1.8	41±1.2*	46±2.2*
LVMI (mg/g)	3.8±0.1	3.9±0.2	4.1±0.2	4.5±0.3	4.5±0.3	4.9±0.8*	3.7±0.1	3.0±0.2*†	3.2±0.2*†	3.5±0.1†	3.4±0.1†	3.4±0.3†
CMD (µm)	16±0.7	18±0.9	17±0.8	18±0.8	17±0.9	17±0.7	15±0.5	13±0.7†	13±0.6†	14±0.8†	14±0.9†	15±0.6†
IA (%)	5.5±0.1	5.5±0.1	6.3±0.6	7.7±0.6	7.7±0.3	7.8±0.3	5.5±0.1	3.8±0.4*†	3.9±0.4*†	3.2±0.1*†	4.3±0.3†	10±1.0*

SO, sham-operated; TAC, transverse aorta constricted; SBPAS, systolic blood pressure in ascending aorta; SBPF, systolic blood pressure in femoral artery; SGr, systolic gradient; HR, heart rate; LVEDD, left ventricle end diastolic diameter; LVESD, left ventricle end systolic volume; LVWT, left ventricle posterior wall thickness; FS, left ventricle fractional shortening; BW, body weight; LVMI,

left ventricle mass index; CMD, cardiac myocyte diameter; IA, interstitium area. Differences were tested by two-way ANOVA and Bonferroni's multiple-range test. * $P < 0.05$ indicated statistical significance compared to values of 4 week banded mice. † $P < 0.05$ compared to values from banded mice treated with siRNA_{GFP}.